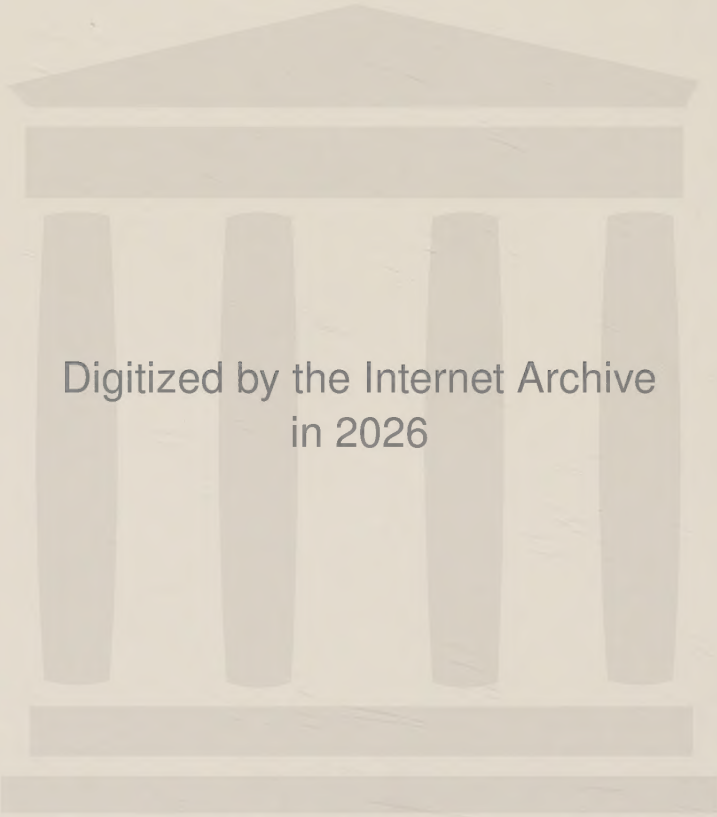


Zur Molekularbiologie
von Retinalproteinen aus
Halobacterium halobium

Heike Vogelsang-Wenke

Diss.
München
1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Zur Molekularbiologie von Retinalproteinen
aus *Halobacterium halobium*

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwigs-Maximilian-Universität München

vorgelegt von
Heike Vogelsang-Wenke

München, 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 17.2.1986

I. ZUSAMMENFASSUNG	1
II. EINLEITUNG	4
1. Archaeobakterien	4
2. Halobakterien	5
2.1 Bacteriorhodopsin	5
2.1.1 Regulation der Bacteriorhodopsin - Expression	6
3. Genetik der Halobakterien	7
3.1 Expression halobakterieller Proteine	8
3.1.1 Homologe plasmidcodierte Expression	8
4. Zielsetzung	11
III. MATERIAL UND METHODEN	13
1. Materialien	13
1.1 Chemikalien	13
1.2 Enzyme	15
1.3 Stämme der verwendeten Organismen	16
1.3.1 <i>Escherichia coli</i>	16
1.3.2 <i>Halobacterium halobium</i>	17
1.4 Vektoren	18
1.5 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen	19
2. Bakterielle Kulturen	20
2.1 Kulturmedien	20
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	20
2.1.2 <i>Halobacterium halobium</i>	21

2.2	Kulturbedingungen	22
2.2.1	<i>Escherichia coli</i>	22
2.2.2	<i>Halobacterium halobium</i>	23
2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	23
2.3.1	Transformation mit enzymatisch ligierten Plasmiden	23
2.3.2	Transformation mit der rekombinanten RF-Formen filamentöser Bacteriophagen	23
2.3.3	Transformation mit homopolymer- ligierten Plasmiden	24
3.	Allgemeine Methoden im Umgang mit DNA	24
4.	Allgemeine Methoden im Umgang mit Proteinen	25
4.1	Ionenpaarextraktion	25
4.2	Amidoschwarzbestimmung	26
4.3	Herstellung von Proteinextrakten	27
4.3.1	Gesamtprotein aus <i>E. coli</i>	27
4.3.2	Proteinextrakte aus <i>Halobacterium halobium</i>	27
5.	Isolierung von DNA	28
5.1	Plasmide aus <i>E. coli</i>	28
5.1.1	Präparative Isolierung	28
5.1.2	Minipräparationen	29
5.2	DNA aus filamentösen Bacteriophagen	30
5.2.1	Präparative Isolierung	30
5.2.2	Minipräparationen von RF-DNA	30
5.2.3	Isolierung von Einzelstrang-DNA	31
5.3	Isolierung von halobakterieller DNA	32
5.3.1	Gesamt-DNA	32
5.3.2	Isolierung chromosomaler DNA ohne Plasmidanteile	33
5.3.3	Isolierung von Halobakterien-Plasmiden	33

5.4	Reinigung von DNA über Sucrosegradienten	34
6.	Homopolymerligation	34
7.	Enzymatische Reaktionen am Substrat DNA	35
7.1	T4-DNA-Ligase	35
7.2	T4-Polynucleotid-Kinase	35
7.3	Restrictionsendonucleasen	36
7.4	DNA-Polymerase I für Nicktranslation	36
7.5	Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	37
7.6	Nuclease Bal 31	38
7.7	Exonuclease III	38
7.8	Terminale Desoxynucleotidyltransferase	39
8.	Elektrophorese von Nucleinsäuren und Proteinen	42
8.1	DNA - Elektrophoresen	42
8.1.1	Nicht-denaturierende Agarosegele (DNA)	42
8.1.2	Polyacrylamid-Harnstoffgele	43
8.2	RNA-Elektrophorese in Formaldehyd- Agarose-Gelen	44
8.3	Gelelektrophorese von Proteinen	45
8.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gradientengele	45
8.3.2	Präparative Gelelektrophorese	46
9.	Transfer von Nucleinsäuren und Protein auf Nitrocellulose	49
9.1	Transfer von DNA	49
9.1.1	Übertragung von DNA aus Agarosegelen	49
9.1.2	Koloniehybridisierung	51
9.1.3	Dot-Blot	51
9.2	Transfer von RNA	52
9.2.1	Northern-Blot	52
9.3	Transfer von Protein auf Nitrocellulose	53
9.3.1	Übertragung von Protein aus SDS-Polyacrylamidgelen	53

9.3.2	Fixierung von <i>E. coli</i> -Kolonien auf Nitrocellulose für Immunotests	54
10.	Elution aus der Gelmatrix	55
10.1	Elution von DNA aus Agarosegelen	55
10.1.1	Elektroelution von DNA-Fragmenten	55
10.1.2	Elution von Oligodesoxynucleotiden aus Polyacrylamid-Harnstoffgelen	55
10.2	Elution von Proteinen	56
10.2.1	Elektroelution mit LKB Multiphor 2117	56
11.	Gewinnung von Antikörpern	57
11.1	Immunisierung	57
11.2	Serumgewinnung	58
11.3	IgG-Anreicherung durch Affinitätschromatographie	58
11.4	FITC-Markierung der IgG-Fraktion	59
11.4.1	Titer- und Spezifitätsbestimmung	59
12.	DNA-Sequenzierung	59
13.	Computer-Analysen	60
IV.	ERGEBNISSE	61
1.	Isolierung des Bacterioopsin-Genes	61
1.1	Aufbau einer Genbank von halobakterieller DNA in pBR322	61
1.1.1	Vorbereitung des Vectors	61
1.1.2	Vorbereitung der halobakteriellen DNA	62
1.1.3	Ligation und Transformation	62
1.2	Hybridisierung	62

1.3	Charakterisierung	65
1.3.1	Restrictionsanalyse	65
1.3.2	Sequenzierung	67
1.4	Bal 31-Deletionsmutanten von pHV18-34	67
1.4.1	pHV18-34ΔE3	67
1.4.2	pHV 18-34ΔB13	70
1.5	Lokalisierung des Bacterioopsin-Genes	71
1.6	Charakterisierung von Mutanten	71
1.7	Expression des Bacterioopsin-Genes	75
1.7.1	Homologe plasmidcodierte Expression	75
1.7.2	Expression des clonierten <i>bop</i> -Genes in <i>E. coli</i>	78
1.7.3	Nachweis der Expression in <i>E. coli</i>	85
2.	Versuch zur Isolierung des Haloopsin-Genes	86
2.1	Beschreibung des verwendeten Vektors	86
2.2	Aufbau der Genbank in pPLC24	86
2.2.1	Vorbereitung des Vektors pPLC24	87
2.2.2	Vorbereitung der chromosomalen Halobakterien-DNA	91
2.2.3	Transformation mit homopolymerligierten Plasmiden	92
2.3	Immunotest der Transformanten	92
2.3.1	Produktion von Antikörpern	92
2.3.2	Test der Antikörper	93
2.3.3	Ergebnis der Immunotests	96
2.3.4	Kontrolle positiver Clone	96
2.4	Charakterisierung der induzierbar exprimierten Proteine	99
2.4.1	Extraktion der Proteine nach Induktion	99
2.4.2	Westernblot	99
2.4.3	Northernblotanalyse	101
2.4.4	Kreuzhybridisierung der Plasmide untereinander	101

2.4.5	Hybridisierung mit dem Chromosom	102
2.4.6	Restrictionskarten und Sequenzierung	102
2.4.7	Antikörper gegen 2 der Fusionsproteine	108
2.4.8	Produktion von Deletionsmutanten der pJS-Plasmide	109

V. DISKUSSION

1.	Isolierung des Bacterioopsin-Genes	112
2.	Isolierung des Genes für das "bacterioopsin- related protein"	113
3.	Untersuchung von Mutanten	114
4.	Expression halobakterieller Gene	118
4.1	Expression des Bacterioopsin-Genes im homologen System	118
4.2	Expression des Bacterioopsin-Genes in <i>Escherichia coli</i>	120
5.	Isolierung des Haloopsin-Genes aus einer Expressionsbibliothek	121

VI.	LITERATUR	125
-----	-----------	-----

VII.	ABKÜRZUNGEN	138
------	-------------	-----

VIII.	ZEICHENERKLÄRUNG	139
-------	------------------	-----

I. ZUSAMMENFASSUNG

Das halobakterielle Membranprotein Bacteriorhodopsin pumpt unter Lichteinwirkung Protonen aus dem Cytoplasma in das Medium und baut so einen Protonengradienten über die Membran auf. Die Primärstruktur der einzigen Polypeptidkette des Bacteriorhodopsins ist sowohl durch Peptidsequenzierung als auch durch Sequenzierung des Bacterioopsin-Genes bekannt, der Mechanismus des Transports kann aber noch nicht erklärt werden. Untersuchungen von Struktur-Funktionsbeziehungen an spezifisch modifizierten Bacteriorhodopsinen sollten genauere Aussagen über die in den Protonentransport involvierten Aminosäuren zulassen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Vektoren für homologe und heterologe Expression zu konstruieren, um mit den in diesen Expressionssystemen produzierten Proteinen Untersuchungen zum Mechanismus des Protonentransportes durchführen zu können. Da die Bacterioopsin-Synthese in vivo wahrscheinlich von der Expression eines benachbarten Genes, des *Brp* (bacterioopsin-related protein) abhängt, mußte dieses Gen in die Konstruktion einbezogen werden. Nach Bekanntwerden einer zweiten lichtgetriebenen Ionenpumpe in der halobakteriellen Membran, des Halorhodopsins, wurde die Isolierung des Haloopsin-Genes ebenfalls angestrebt. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- (1) Das Bacterioopsin-Gen (*bop*) wurde isoliert und durch Restrictionsanalysen und partielle Sequenzierung charakterisiert. Um das *bop*-Gen auf einem Restrictionsfragment mit definierten überstehenden Enden zur Verfügung zu haben, wurde das *bop*-Gen tragende Plasmid pHV18-34 durch Deletion und Linkerclonierung verändert.

- (2) Die Expression des *bop*-Genes in *Halobacterium halobium* scheint von der Expression des "Bacterioopsin related proteins" (*brp*) abhängig zu sein. Dieses Gen muß daher in die Konstruktion von Vektoren zur homologen Expression einbezogen werden. Das *brp*-Gen wurde daher isoliert und ebenfalls auf Grund von Restrictionsanalysen identifiziert.
- (3) Durch Southernblot-Analysen mit Gesamt-DNA aus *Halobacterium halobium*, mit gereinigter chromosomaler DNA und isoliertem Plasmid wurde die Lokalisierung des Bacterioopsin-Genes im GC-reichen Anteil chromosomaler DNA nachgewiesen.
- (4) Bacterioopsindefiziente Mutanten wurden durch Restrictionsanalyse vorläufig charakterisiert.
- (5) Für die homologe Expression in *Halobacterium halobium* wurde ein Vektor konstruiert, der zur Selektion phototropher Zellen nach Transformation einer Bop⁻-Mutante befähigen sollte. Dieser Vektor enthält neben den zur Replikation und Selektion in *Escherichia coli* notwendigen Bestandteilen (Col E 1-Replikationsorigin und β -Lactamase-Gen) einen Replikationsorigin für Halobakterien aus *Halobacterium* GRB, das *brp*- und das *bop*-Gen in der natürlichen Anordnung.
- (6) Für die heterologe Expression in *E. coli* wurde ein Vektor konstruiert, der aus dem Expressionsplasmid pPLC24 (Remaut et al., 1981) abgeleitet wurde. Der Vektor wurde so konstruiert, daß die ersten beiden Aminosäuren der codierenden Sequenz der MS2-Polymerase (Met, Ser) mit der ersten Aminosäure des reifen Bacterioopsins verbunden werden, wobei ein Serin auch der letzten Aminosäure des beim Prozessieren des Bacterioopsinvorläufers abgespaltenen Peptides entspricht. Die Konstruktion involviert die Clonierung

eines Oligonucleotidhybrides unter Regeneration einer Restrictionsendonucleasespaltstelle. Die Fusionsstellen im Vektor wurden sequenziert.

- (7) Für die Isolierung des Haloopsin-Genes wurde eine Expressionsgenbank in dem Expressionsvektor pPLc24 angelegt. 80000 Transformanten wurden mit 2 verschiedenen, unterschiedlich spezifischen Antikörpern auf die Expression der antigenen Determinante des Haloopsins getestet. Die dabei isolierten Clone (JS-Clone) wurden analysiert und die halobakteriellen Inserts ganz oder teilweise sequenziert. Für keinen der analysierten Clone ergaben sich Homologien mit den für die bekannten Haloopsin-Peptide erwarteten Sequenzen.
- (8) Es wurde versucht, 2 der 5 JS-Clone näher zu charakterisieren. Die Länge der mRNA wurde bestimmt und Antikörper gegen die Fusionsproteine erzeugt. Für diese Antikörper konnte keine Kreuzreaktion mit Halorhodopsin nachgewiesen werden.
- (9) Die antigene Determinante eines der im Immunotest isolierten Clone wurde durch Deletionsmutanten eingegrenzt.

II. EINLEITUNG

1. Archaeobakterien

Das von Woese und Fox (1977) postulierte Urreich der Archaeobakterien umfaßt eine äußerst heterogene Gruppe von Organismen, die alle extremen Lebensbedingungen angepaßt sind. Sie unterscheiden sich von den Eubakterien generell im Aufbau ihrer Zellwand, die keine Mureinsäure enthält (König & Kandler, 1979) und in der Zusammensetzung ihrer Membranen, deren Lipide nicht aus Estern unverzweigter Fettsäuren, sondern aus Phytanylethern aufgebaut sind (Langworthy et al., 1982). Alle Archaeobakterien weisen eine komplizierte, aus 7-12 Untereinheiten zusammengesetzte RNA-Polymerase auf, für die durch gemeinsame strukturelle und immunologische Merkmale bewiesen ist, daß sie den eukaryontischen RNA-Polymerasen aus Hefe starker ähnelt als den eubakteriellen (Huet et al., 1983; R. Schnabel et al., 1983). Ähnlichkeiten zwischen Archaeobakterien und Eukaryonten finden sich auch beim Translationsapparat: der archaeobakterielle Elongationsfaktor EF II ist ADP-ribosylierbar (Kessel & Klink, 1980), Anzahl und Sequenz ribosomaler Proteine sind vergleichbar (Matheson & Yaguchi, 1982). Als weiteres eukaryontisches Merkmal fanden Kaine et al. (1983) bei 2 verschiedenen Transfer-RNA-Genen Introns, Garret et al. (1985) in ribosomalen Genen. Fox et al. unternahmen es (1980), durch den Vergleich eubakterieller, archaeobakterieller und eukaryontischer 16S bzw. 18S rRNA-Sequenzen nach Berechnung der S_{AB} -Werte einen neuen Stammbaum aufzustellen, der die evolutionäre Distanz der Archaeobakterien von den Eubakterien und den Eukaryonten dokumentiert. Die weitere

Unterteilung der Archaeobakterien in die schwefelabhängigen Thermophilen mit den Ordnungen Sulfolobus, Thermoproteus und Pyrodictium einerseits und die Methanogenen mit Halophilen und Thermoplasma andererseits beruht auf einer Fülle von Daten aus Sequenzierungen von 5S rRNAs (De Wachter, 1984; Nicholson jr. et al., 1985) und ribosomalen Proteinen, auf der funktionellen und strukturellen Analyse der RNA-Polymerasen und Translations-Elongationsfaktoren sowie auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Ribosomen (Stöffler-Meilicke et al., 1985; Lake, 1982).

2. Halobakterien

Die Halobakterien gehören zur Gruppe der halophilen Archaeobakterien. Ihr Biotop muß eine Konzentration von 20-25 % NaCl aufweisen, unterhalb etwa 12 % lysieren sie. Optimale Wachstumsbedingungen finden diese Organismen z.B. in Salzseen oder Salzgewinnungsanlagen. Wahrscheinlich in Anpassung an den in konzentrierten Salzlösungen sehr niedrigen Sauerstoffpartialdruck haben die Halobakterien neben der oxidativen Phosphorylierung ein zweites energielieferndes System entwickelt, das ihnen ATP-Synthese durch Photophosphorylierung erlaubt (Oesterhelt, 1974; Danon & Stoeckenius, 1974; Hartmann & Oesterhelt, 1977).

2.1 Bacteriorhodopsin

Durch das Membranprotein Bacteriorhodopsin (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971) wird unter Lichteinfluß ein elektrochemischer Protonengradient über die Membran aufgebaut, der eine ATP-Synthase antreibt. Bacteriorhodopsin ist bereits recht gut charakterisiert: es besteht aus einer Polypeptidkette von 248 Aminosäuren, deren Sequenz inzwischen ebenso wie die Sequenz des Genes bekannt ist (Khorana et al., 1979;

Ovchinnikov et al., 1979; Dunn et al., 1981). Der genaue Mechanismus der Protonentranslocation ist noch unbekannt. Durch Untersuchungen der Struktur-Funktionsbeziehungen am veränderten Chromoprotein sollten Aussagen über den genauen Ablauf des Elektronentransportes möglich werden. Modifikationen des Retinals erlauben jedoch nur Aussagen über die Rolle des Retinals im Photocycly und zeigen Wechselwirkungen zwischen dem Retinal und den Aminosäuren der Bindungsstelle auf. Sie geben keinen Hinweis auf den Mechanismus der Protonentranslocation durch die Membran, die über geladene bzw. aromatische Aminosäuren-Seitenketten ablaufen sollte. Voraussetzung für die Identifizierung der unmittelbar an der Protonentranslocation beteiligten Aminosäuren sind entweder Kristallstrukturdaten, die zur Zeit noch nicht zur Verfügung stehen, oder spezifisch modifizierte Bacteriorhodopsine, deren Funktion im Vergleich zum nativen Bacteriorhodopsin Aufschluß über die am Transport beteiligten Seitenketten geben konnte. Chemische Modifikationen am Protein jedoch betreffen meistens nicht nur eine einzelne Aminosäure, sondern alle für das modifizierende Agens zugänglichen Gruppen. Gezielte Modifikationen der funktionellen Gruppen des Proteins sind jedoch auf Nucleinsäureebene möglich. Durch spezifische Mutagenese kann am isolierten Gen die Nucleotidsequenz so verändert werden, daß im Genprodukt die relevante Aminosäure durch eine andere ersetzt wird (Zoller & Smith, 1983; Kramer et al., 1984).

2.1.1 Regulation der Bacteriorhodopsin - Expression

Die Bacteriorhodopsin-Expression wird in vivo offenbar durch Sauerstoff reprimiert. Bei Sauerstoffmangel wird das alternative Phosphorylierungssystem aktiviert und Bacteriorhodopsin synthetisiert, wobei Retinal eine stimulierende Wirkung auf die Expressionrate hat (Schoningh, 1985). Für keinen der beiden Prozesse gibt es schon Erklärungen auf molekularer Ebene.

3. Genetik der Halobakterien

Bei Untersuchungen an den halobakteriellen Plasmiden (Weidinger et al., 1979; Pfeifer et al., 1981 a,b), dem Bacterioopsin-Gen und den ihm benachbarten Bereichen (Simsek et al., 1982; Betlach et al., 1983; Pfeifer et al., 1983; DasSarma et al., 1983; Pfeifer et al., 1984; Ovchinnikov et al., 1984) und bei der Charakterisierung des Halobakterien-Phagen ϕ H (Schnabel et al., 1982; Schnabel & Zillig, 1983) wurde eine extreme Variabilität der DNA gefunden, die durch Insertionselemente und Transposons verschiedener Größe verursacht wird. Weidinger et al. (1979) und Pfeifer et al. (1981b) beobachteten im Zusammenhang mit Veränderungen des *Halobacterium halobium*-Plasmides pHH1 den spontanen Verlust von phänotypisch erkennbaren Merkmalen wie der Gasvakuolenproduktion, der Bacterioruberin- und der Bacterioopsinsynthese. Mehrere Autoren (s.o.) konnten für bacterioopsinnegative Mutanten Insertionen im Bacterioopsin-Gen selbst und in genaufwärts gelegenen Sequenzen feststellen. Durch die Untersuchungen von Betlach et al. (1984) ist bekannt, daß die Expression des Bacterioopsins durch Insertionen noch im 1500 bp genaufwärts gelegenen Bereich inhibiert wird. Sie konnten ca. 500 bp genaufwärts vom Translationsstart des Bacterioopsins den Beginn eines offenen Leserasters identifizieren, das in die dem Bacterioopsin entgegengesetzte Richtung transkribiert wird. Alle beobachteten, die Bacterioopsinsynthese inhibierenden Insertionsereignisse liegen innerhalb dieses Leserasters von 1077 bp. Die Expression dieses "bacterioopsin related protein" (*brp*) genannten Genes scheint für die Expression des Bacterioopsins Voraussetzung zu sein. Pfeifer et al. (1985a) beschreiben darüberhinaus die Revertante einer durch Insertion in den C-terminalen Teil des *brp* - Genes bacterioopsindefizienten Mutante, die nach zusätzlicher

Insertion eines offenbar durch Rekombination mit pHH1 insertierten Fragmentes wieder Bacterioopsin produziert. H. Schnabel schließlich beobachtete bei dem Bacteriophagen ϕ H eine hohe Variabilität, die sie auf Reorganisationen des Genoms sowie ebenfalls auf Insertions-, Deletions- und Inversionsereignisse zurückführen konnte (Schnabel et al., 1982, 1983).

3.1 Expression halobakterieller Proteine

Alle erwähnten Ergebnisse beschränken sich auf die descriptive Analyse beobachtbarer Genomveränderungen. In das Genom von *Halobacterium halobium* oder das eines Bacteriophagen einzugreifen und modifizierte Sequenzen in vivo exprimieren zu lassen, ist bis jetzt nicht möglich. Dazu fehlt nicht nur ein geeigneter Vektor, der mit den halobakteriellen Origin- und Signalsequenzen ausgestattet ist, sondern auch ein effizientes Transformationssystem.

3.1.1 Homologe plasmidcodierte Expression

Für *Halobacterium halobium* ist bisher kein Transformationssystem bekannt. Zwar wurde für *Halobacterium volcanii* kürzlich Gentransfer zwischen auxotrophen Mutanten beschrieben (Mevarech & Werczberger, 1985) der jedoch auf Zellfusion zu beruhen scheint. Die Schwierigkeiten, die mit der Etablierung eines Transformationssystems verbunden sind, sind folgende:

(1) Genetische Instabilität

Phänotypisch beobachtbare Marker wie die Expression von Bacterioruberinen und Bacteriorhodopsin oder die Bildung von Gasvakuolen unterliegen Mutation und mit wenigen Ausnahmen auch Reversion mit Frequenzen zwischen 10^{-2} und 10^{-4} . Spontane oder nach UV-Mutagene-

se selektionierte auxotrophe Mutanten weisen ebenfalls extrem hohe Reversionsraten auf. Die genetische Instabilität wird durch transponierbare Elemente verursacht, deren bisher rund 10 verschiedene charakterisiert worden sind (s.o. und Xu & Doolittle, 1983). Sie duplizieren wie prokaryontische Transposons die Ziel-DNA, im Gegensatz zu aus *E. coli* bekannten Elementen (Übersicht in Calos & Miller, 1980) zeigen sie aber weder eine erkennbare Stellenspezifität noch duplizieren sie bei der Insertion eine konstante Anzahl von Basenpaaren. Dennoch scheint es Insertions-"hot spots" zu geben, da zwar Merkmale wie z.B. die Fähigkeit zur Bacterioopsinsynthese mit relativ hoher Frequenz durch Insertionselemente verloren gehen, andererseits aber in allen untersuchten Mutanten der benachbarte Bereich von ca. 40 kb keine weiteren Insertionen erfahren hat (Pfeifer et al., 1985).

(2) Replikations-, Transcriptions- und Translationssignale

In vitro Konstruktionen von Vektoren für Halobakterien waren solange aussichtslos, wie weder ein Replikationsorigin auf einem Fragment annehmbarer Größe zur Verfügung stand, noch die Strukturen halobakterieller Promotoren und Ribosomenbindungsstellen bekannt waren. In den letzten 2 Jahren sind jedoch folgende Voraussetzungen geschaffen worden:

- (a) Aus den natürlichen *Halobacterium*-Isolaten GRB, SB3 und GN101 ist ein 1,6 kb großes Plasmid isoliert worden, das in diesen Halobakterien-Stämmen autonom repliziert wird, also einen Replikations-Origin tragen muß (Ebert et al., 1984). Das Plasmid enthält 2 offene Leserahmen (ORF's) und eine einzelne *Sal* I-Stelle, die außerhalb der ORF's in einer für einen Origin untypischen Sequenz liegt (persönl. Mitteilung aus dem Labor Goebel).

(b) Für das *bop*-Gen (Dunn et al., 1981) und das *brp*-Gen (Betlach et al., 1984) sind die jeweiligen genaue aufwärts liegenden Sequenzen bekannt. Beide Gene weisen im Bereich -35 bis -50 und -45 bis -60, bezogen auf das jeweilige Startcodon, einander homologe Sequenzen auf, deren Anordnung entfernt an die aus Prokaryonten bekannten Promotoren erinnert. Allerdings gibt es keine Übereinstimmungen zwischen diesen potentiellen Promotoren und den Sequenzen, die im upstream-Bereich von halobakteriellen rRNA- oder tRNA-Genen gefunden werden (Dennis, 1985; Daniels et al., 1985).

(c) Die bisher untersuchten Transkripte für Strukturproteine, die *bop*-mRNA und der *brp*-mRNA, beginnen entweder mit dem AUG der codierenden Sequenz (*brp*; Betlach et al., 1984) oder an der Position -2 (*bop*; DasSarma et al., 1983). Beiden gemeinsam ist also das Fehlen einer offensichtlichen Shine-Dalgarno Sequenz vor dem Startcodon. Beide Transkripte aber weisen am 5' Ende der codierenden Region Sequenzen auf, die komplementär den 3'terminalen Sequenzen der halobakteriellen 16S rRNA sind (Kagrananova et al., 1982; Mankin et al., 1985). Betlach et al. (1984) haben deshalb vorgeschlagen, die Ribosomenbindestelle dieser beiden Gene liege am Beginn der codierenden Sequenz.

(3) Der Selektions-Marker

Bisher sind die Gene für Bacterioopsin und das "bacterioopsin related protein" aus *Halobacterium halobium* isoliert und charakterisiert. Gene für Enzyme aus dem Aminosäurestoffwechsel, mit denen das Genom auxotropher Mutanten komplementiert und durch Ausüben von Selektionsdruck für Transformatanten selektioniert werden könnte, sind bisher ebensowenig isoliert wie Gene für Antibiotikaresistenz vermittelnde Proteine. Als Selektions-Marker steht zur Zeit nur die

Plauebildung nach Transfection mit Phagen-DNA zur Verfügung. Transfection mit der DNA des Halobakterien Phagen ϕ H ist unter verschiedenen in der Literatur für grampositive und gramnegative Bakterien und für Eukaryonten beschriebenen Bedingungen erfolglos versucht worden (Vogelsang und Schnabel, unveröffentl. Ergebnisse). Der Nachteil dieses relativ gut charakterisierten Phagen ist die Größe seines Genoms (59 kb), kleinere Halobakterien-Phagen sind jedoch noch nicht ausreichend charakterisiert.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Selektion über phototrophes Wachstum (Oesterhelt & Krippahl, 1983). Ein einzelnes zur Photophosphorylierung fähiges Halobakterium kann unter 10^7 photophosphorylierungsdefizienten durch Anreicherung unter anaeroben Bedingungen noch identifiziert werden. Dieses Selektionssystem könnte bei der Transformation stabiler Bop⁻ Ret⁺ Zellen Anwendung finden. Die Komplementation von Bop-Mutanten, die entweder im *brp* - Gen oder im *bop* - Gen mutiert sein können, sollte sinnvollerweise mit einem beide Gene enthaltenden Konstrukt ausgeführt werden. Die Expression von Bacterioopsin bietet sich als der einzige Marker an, mittels dessen durch Selektionsdruck, in diesem Fall Phototrophie, transformierte Zellen selektio- niert werden können.

4. Zielsetzung

Inhalt dieser Arbeit sollte sein, das Gen für Bacteriorhodopsin zu isolieren, zu charakterisieren und Vektoren für die homologe oder heterologe Expression des Bacterioopsin-Genes zu konstruieren. Diese Aufgabenstellung blieb auch gültig, nachdem Dunn et al. während dieser Arbeit die Isolierung des Bacterioopsin-Genes publiziert hatten, da wir das Bacterioopsin-Gen aus dem Arbeitskreis von Khorana

nicht bekommen konnten. Die Publikation erleichterte allerdings die Isolierung des Genes, da auf die Synthese einer cDNA-Bank verzichtet und stattdessen ein spezifisches Oligodesoxyribonucleotid zur Koloniehybridisierung eingesetzt werden konnte. Parallel zu meiner Arbeit akkumulierten durch die Dissertationen von M. Steiner (Steiner 1984) und P. Hegemann (Hegemann 1984) Informationen über ein zweites Retinalprotein aus *Halobacterium halobium*, das Halorhodopsin. Halorhodopsin erwies sich als dem Bacteriorhodopsin in mehrererlei Hinsicht sehr ähnlich: beide Proteine sind lichtgetriebene Ionenpumpen, beide enthalten Retinal als prosthetische Gruppe, ihre Absorptionsmaxima unterscheiden sich nur um 10 nm, die apparenten Molekulargewichte sind fast identisch. Durch die Arbeiten von Schobert und Lanyi (1982) und Bamberg et al. (1984) wurde bewiesen, daß Halorhodopsin eine lichtgetriebene Chloridpumpe ist. Als im Jahr 1982 durch die von P. Hegemann und M. Steiner ausgearbeiteten Halorhodopsin-Anreicherungsverfahren für eine Immunisierung von Kaninchen ausreichende Mengen dieses Proteins verfügbar wurden, erweiterte sich die Zielsetzung dieser Arbeit um die Isolierung und Charakterisierung des Halorhodopsin-Gens.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

1.1 Chemikalien

Acrylamid	Biorad, München, FRG
Agarose ME	Serva, Heidelberg, FRG
Albumin aus Rinderserum	Seakem, Marine Colloids Div. FMC Corp., Rockland, ME USA
Amidoschwarz	Sigma, München, FRG
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, München, FRG
Ampicillin	Biorad, München, FRG
Bacto-Agar	Sigma, München, FRG
Bacto-Pepton	Difco, Detroit, Michigan, USA
Bacteriological Pepton, Code L 37	Difco, Detroit, Michigan, USA
Bacto-Trypton	Oxoid, Wesel, FRG
Bindsilan	Difco, Detroit, Michigan, USA
Bisbenzimid	LKB, Gräfelfing, FRG
Borsäure	Sigma, München, FRG
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Sigma, München, FRG
Bromphenolblau	Boehringer Mannheim, FRG
Cäsiumchlorid	Sigma, München, FRG
Chloramphenicol	Baker, Großgerau, FRG
DNA-Längenstandards	Boehringer Mannheim, FRG
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim, FRG

Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Sigma, Munchen, FRG
FITC-konjugierte Ziegen- anti Hasen Antikörper	Sigma, Munchen, FRG
Freund'sches Adjuvans (komplettes und inkomplettes)	Behring Werke, Marburg, FRG
Haloopsin (denaturiert)	isoliert von M. Steiner
Haloopsin (nativ)	isoliert von P. Hegemann beide aus dem Arbeitskreis Oesterhelt
HA-Ultrogel	Pharmacia, Freiburg, FRG
Harnstoff	Sigma, München, FRG
Hefeextrakt	Difco, Detroit, Michigan, USA
Hydrazin	Roth, Karlsruhe, FRG
Hydroxylapatit	Biorad, Munchen, FRG
8-Hydroxychinolin	Serva, Heidelberg, FRG
Isopropyl- β -D- thiogalactopyranosid (IPTG)	Boehringer Mannheim, FRG
Kanamycin	Sigma, München, FRG
3MM Chromatographiepapier	Whatman Ltd., Maidstone, UK
Natriumchlorid reinst für Halobakterienzucht	Deutsche Solvay Werke GmbH, Solingen, FRG
Nitrocellulose 0,45 μ m für Protein- und DNA-Transfer	Schleicher & Schüll, Dassel, FRG
für Filtration von DNA	Millipore,
N,N-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg, FRG
	Biorad, München, FRG
Nucleotidtriphosphate	Boehringer Mannheim, FRG
Oligodesoxyribonucleotide	
a) für Koloniehybridisierung	PL Biochemicals, St. Goar
b) für Vektorkonstruktion	Synthese am "Automatic Synthesizer 380 A" (Applied Biosystems), Abtlg. Oesterhelt
Phenylmethylsulfonylchlorid (PMSF)	Boehringer Mannheim, FRG

Polyethylenglycol (PEG) 6000	Roth, Karlsruhe, FRG
PEI-Cellulose m. Fluoreszenz- indikator	Schleicher & Schüll, Dassel, FRG
Piperidin	Sigma, München, FRG
Protein A Sepharose 4CL	Pharmacia, Freiburg, FRG
Radiochemikalien	Amersham-Buchler, Braunschweig, FRG New England Nuclear, Dreieich, FRG
Repelsilan	LKB, Gräfelfing, FRG
SDS	Serva, Heidelberg, FRG
Sephadex G 25, G 50 und G 75	Pharmacia, Freiburg, FRG
Tetracyclin	Boehringer Mannheim, FRG
TEMED	Biorad, München, FRG
Trizma	Sigma, München, FRG
Xylencyanol	Sigma, München, FRG

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von der Firma Merck in Darmstadt bezogen.

1.2 Enzyme

DNA Polymerase I (<i>E. coli</i>) für Nicktranslation	Boehringer Mannheim, FRG
DNA Polymerase I Klenow- Fragment (<i>E. coli</i>)	BRL, Neu Isenburg, FRG
T4 DNA Ligase (T4-infizierter <i>E. coli</i>)	Boehringer Mannheim, FRG u. von W. Oertel
T4 DNA Polymerase (T4-infizierter <i>E. coli</i>)	PL Biochemicals, St. Goar, FRG
Bakterielle alkalische Phosphatase (BAP)	Worthington, Freehold und Boehringer Mannheim
Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim, FRG

aus Kälberdarm (CIP)	
Exonuclease III (<i>E. coli</i>)	BRL, Neu Isenburg, FRG
Nuclease S1 (<i>Aspergillus oryzae</i>)	PL Biochemicals, St. Goar, FRG
Nuclease Bal 31	New England Biolabs, Schwalbach, FRG
Terminale Desoxynucleotidyl- transferase	PL Biochemicals, St. Goar, FRG
T4-Polynucleotidkinase (T4-infizierter <i>E. coli</i>)	New England Biolabs, Schwalbach, FRG
Lysozym	Boehringer Mannheim, FRG
Pronase	Boehringer Mannheim, FRG
Ribonuclease A	Boehringer Mannheim, FRG
Restrictionsendonucleasen	Boehringer Mannheim, FRG BRL, Neu Isenburg, PL Biochemicals, St. Goar, New England Biolabs, Schwalbach, alle FRG.

1.3 Stämme der verwendeten Organismen

1.3.1 *Escherichia coli*

(1) *E. coli* HB 101:

F^- , *hsdS20* (r_B^- , m_B^-), *recA13*, *ara-14*, *proA2*, *lacY1*,
galK2, *rpsL20* (Sm^r), *xyl-5*, *mtl-1*, *supE44*, λ^- (Boyer
und Roulland-Dussoix 1969; erhalten von W. Oertel)

(2) *E. coli* RR1

recA+, ansonsten identisch mit HB 101 (Bolivar et al.
1977; erhalten von H. Putzer)

(3) *E. coli* 5K

leu-, *thr-*, *thi-*, r_K^- , m_K^+ (Hubacek & Glover, 1970;

erhalten von H. Schrempf)

- (4) *E. coli* W6 (λ)
 Prototrophes Derivat von *E. coli* K12; λ -Lysogen
 (erhalten von W. Klump).
- (5) *E. coli* BMH 71-18
 $\Delta(lac-proAB)$, thi^- , $supE$; $F' lac i^q$, $ZAM15$, $pro A^+B^+$
 (Kramer et al., 1984; erhalten von H.-J. Fritz).

1.3.2 *Halobacterium halobium*

- (1) *Halobacterium halobium* NRL R1M1 (Rub^- , Vac^-) ist ein
 Derivat des Wildtypstammes NRC 34020 (Stoeckenius et
 al., 1979) und wurde in unserem Labor aus der
 vakuolenfreien Mutante R1 isoliert (Milanytch, 1973).
- (2) *Halobacterium halobium* S9 ist ein Bacterioopsin
 überproduzierender Stamm aus (1)
- (3) *Halobacterium halobium* L 33 ist eine Bacterioopsin-de-
 fiziente Mutante von S9 (Wagner et al., 1981).

Die phänotypischen Eigenschaften aller verwendeten
 Stämme sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

	Bop	Hop	Rub	Ret	Literatur
<i>H. halobium</i>	+	+	+	+	Stoeckenius 1979
NRC 34020					
<i>H. halobium</i> R1M1	+	+	-	+	Milanytch 1973
<i>H. halobium</i> S9	++	+	-	+	Stoeckenius 1979
<i>H. halobium</i> L 07	-	+	-	-	
<i>H. halobium</i> L 33	-	+	-	+	Wagner 1981
<i>H. halobium</i> OD 2	-	++	+	+	Bogomolni 1982
<i>H. halobium</i> M18	+	-	-	+	

<i>H. halobium</i> M20	-	+	+	+
<i>H. halobium</i> M24	-	-	-	+
<i>H. halobium</i> M114	-	+	+	+
<i>H. halobium</i> M180	-	-	-	+
<i>H. halobium</i> M187	-	-	-	+
<i>H. halobium</i> M188	-	+	+	+
<i>H. halobium</i> M191	-	-	-	+
<i>H. halobium</i> 43RR	-	+	+	+
<i>H. halobium</i> 43RW	-	-	-	+
<i>H. halobium</i> Flx 3	-	-	-	+

Bogomolni 1982

-: phänotypisch nicht nachweisbar

+: normale Mengen des entsprechenden Merkmals

++: Überproduzent

Bei den Literaturstellen ist jeweils nur der Erstautor angegeben. Mutanten ohne Literaturzitat sind in unserem Labor selektiert worden.

1.4 Vektoren

(1) pBR 322 (Bolivar et al., 1977)

(2) pPLc 24 (Remaut et al., 1981)

(3) pcI857 (Remaut et al., 1983)

(4) M13mp8 und M13mp9 (Messing und Vieira, 1982; Vieira und Messing, 1982)

(5) M13mp18 und M13mp19 (Yanisch-Perron et al., 1985)

1.5 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

(1) TE-Puffer:

Tris-HCl	50 mM	
Na ₂ EDTA	1 mM	pH 7.5

(2) Ethidiumbromid-Stammlösung:

Ethidiumbromid	10 mg/ml TE-Puffer
----------------	--------------------

(3) Isobutanol/TE:

Isobutanol, gesättigt mit TE-Puffer

(4) Phenol/TE:

Phenol aus einer frisch geöffneten Flasche wurde dreimal mit 100 mM Tris-HCl pH 7,5 ausgeschüttelt und mit 0,08 % 8-Hydroxychinolin stabilisiert.

(5) Chloroform-Isobutanol:

24 Volumenteile CHCl ₃
1 Volumenteil Isobutanol

(6) 20 x SSC:

NaCl	3 M
Trinatrium-Citrat	0.3 M
eingestellt auf	pH 7.2

(7) 20 x SSPE:

NaCl	3.6 M
EDTA	20 mM
NaH ₂ PO ₄	0.2 M
eingestellt auf	pH 7.4

2. Bakterielle Kulturen

2.1 Kulturmedien

2.1.1 *Escherichia coli*

(1) ENB (enriched nutrient broth)

Bacto-Pepton	5,0 g
Glucose	1,0 g
KH_2PO_4	1,5 g
Na_2HPO_4	3,5 g
NaCl	5,0 g
Thiamin	5 mg
	ad 1 Liter.

(2) LB (Luria Bertani) - Medium

Bacto-Trypton	10,0 g
Hefe-Extrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
	ad 1 Liter.

Agarplatten wurden durch Zufügen von 1,5% Agar zum Medium hergestellt.

(3) Weichagar

Bacto-Trypton	10,0 g
NaCl	5,0 g

MgSO ₄ (1M)	1 ml
Bacto-Agar	6,5 g
	ad 1 Liter.

(4) Selektive Medien

Zur Selektion von Transformanten bzw. zur Aufrechterhaltung eines Selektionsdruckes wurden den Medien gegebenenfalls folgende Antibiotika zugefügt:

Ampicillin	50 mg/l
Tetracyclin	20 mg/l
Kanamycin	20 mg/l

Amplifikation von Plasmiden mit Col E 1 Origin (Clewell, 1972) wurde durch Zusatz von

Chloramphenicol	100 mg/l
-----------------	----------

in der frühen log-Phase einer Kultur erreicht.

(5) IPTG-Platten

IPTG-Platten für die Arbeit mit M13mp-Bakteriophagen sind LB-Platten, deren Medium nach dem Autoklavieren 50 mg/l IPTG (Endkonzentration 0,2 mM) zugefügt worden ist.

2.1.2 *Halobacterium halobium*

(1) Komplex-Medium (Oesterhelt und Stoeckenius, 1974)

NaCl	250 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20 g
Na ₃ Citrat	3 g
KCl	2 g
Oxoid-Pepton Code L 37	10 g

ad 1 Liter; pH 7,2.

Agarplatten wurden durch Zusatz von 1,5% Agar hergestellt.

(2) Basalsalz

Als Basalsalz wird die Salzlosung des Komplexmediums ohne Peptonzusatz bezeichnet.

2.2 Kulturbedingungen

2.2.1 *Escherichia coli*

- (1) *E. coli*-Schüttelkulturen wurden je nach Bedarf angezogen:

5 ml Medium	in Reagenzgläsern
10 ml Medium	50 ml Erlenmeyerkolben
100 ml Medium	300 ml Erlenmeyerkolben
1 l Medium	2 l Erlenmeyerkolben.

Für Einzelstrangpräparationen von M 13-Phagen wurde 5-7 h bei 37°C und 150 rpm inkubiert, in allen anderen Fällen bei 30°C oder 37°C und 150 rpm über Nacht.

- (2) Wachstum auf Agarplatten erfolgte bei 30°C oder 37°C über Nacht; Zellen für Koloniehybridisierung wurden nach dem Transfer auf einen Nitrocellulosefilter für weitere 24 h auf chloramphenicolhaltigen Platten inkubiert, Kolonien für immunologische Tests wurden nach dem Transfer auf Nitrocellulose für 5 h bei 43°C inkubiert.

2.2.2 *Halobacterium halobium*

Wachstum von Halobakterien fand bei 40°C unter Standardbedingungen statt (Oesterhelt und Stoeckenius, 1974).

2.3 Transformation von *E. coli*

Transformationen von *E. coli* wurden mit der CaCl_2 -Methode (Mandel und Higa, 1970) durchgeführt.

2.3.1 Transformation mit enzymatisch ligierten Plasmiden

100 ml frisches LB-Medium wurden mit 4 ml einer frischen Übernachtskultur des zu transformierenden Stammes angeimpft und für ca. 2 Stunden, bis zur $\text{OD}_{600}=0,5$ bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Die Kultur wurde dann auf Eis gestellt und bei 0°C, 5000 rpm in sterilen Röhrchen abzentrifugiert. Die Zellen wurden entweder zweimal in 10 ml 50 mM CaCl_2 gewaschen und anschließend für 15 bis 20 Stunden in 1,5 ml 50 mM CaCl_2 bei 0°C inkubiert, oder aber zweimal in 10 ml 100 mM CaCl_2 gewaschen und für 30 bis 90 min in 1,5 ml 100 mM CaCl_2 auf Eis gestellt. Anschließend wurden 200 μl der nunmehr kompetenten Zellen mit 100 μl der DNA-Probe in 100 mM CaCl_2 gemischt und 30 sec bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden wieder für 90 min bei 0°C inkubiert und dann 3 min bei 42°C hitzebehandelt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurden die Zellen 1 Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert, bevor sie auf selektiven Platten ausgestrichen wurden.

2.3.2 Transformation mit der rekombinanten RF-Formen filamentöser Bakteriophagen

Transformation von *E. coli* mit der RF I-Form von M13-Derivaten oder fd 109 erfolgte wie unter III.2.3.1 beschrieben. Abweichungen:

(1) M13mp-Derivate

wurden nach Transformation wie oben beschrieben ohne Zugabe von 1 ml LB-Medium sofort in Weichagar eingegossen, indem Aliquots des Transformationsansatzes mit 30 μ l X-Gal-Lösung (20 mg/ml Dimethylformamid), 200 μ l frischer Wirtszellkultur (BMH 71-18) und 3 ml Weichagar (45°C) gemischt und auf IPTG-Platten ausgegossen wurden.

(2) fd 109-Rekombinanten

wurden nach Zugabe von 1 ml LB-Medium sofort auf ampicillinhaltige Agarplatten ausgestrichen.

2.3.3 Transformation mit homopolymerligierten Plasmiden

Für die Transformation mit homopolymerligierten Plasmiden wurde immer der Stamm *E. coli* RR1[pcI857] verwendet. Die Kompetenz der Zellen wurde durch die Behandlung mit CaCl_2 nach Mandel und Higa (1970) wie oben beschrieben erreicht. Von der Vorschrift in III.2.3.1 abweichend wurde jedoch der Hitzeschock bei 37°C und die einstündige "Erholungs"inkubation vor dem Plattieren bei 28°C durchgeführt.

3. Allgemeine Methoden im Umgang mit DNA

(1) Phenolextraktion:

Die nucleinsäurehaltigen Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen an Phenol/TE gut gemischt und zur Erleichterung der Phasentrennung zentrifugiert (2 min Eppendorfszentrifuge bzw. 5 min bei 8000 rpm). Phenolextraktionen wurden normalerweise dreimal hintereinander durchgeführt, für Minipräparationen jedoch nur einmal, nach Behandlung mit bakterieller

alkalischer Phosphatase allerdings fünfmal.

(2) Chloroformextraktion:

Mit einem Gemisch aus 24 Teilen Chloroform und einem Teil Isobutanol wurden Phenolspuren entfernt.

(3) Fallen von DNA:

DNA wurde routinemaßig durch Zugabe von 1/10 Volumen 10 M LiCl und 2,5 Volumen Ethanol p.a. 15 bis 30 min bei -70°C präzipitiert. Nach der Zentrifugation (entweder 5 min in der Eppendorfzentrifuge oder 10 min im SS 34 bei 10000 rpm) wurde der Niederschlag zweimal mit 70%igem Ethanol und einmal mit Ethanol p.A. gewaschen. Die Proben wurden unter Wasserstrahlvakuum im Exsikkator getrocknet und die getrocknete DNA im jeweils angebrachten Puffer aufgenommen.

4. Allgemeine Methoden im Umgang mit Proteinen

4.1 Ionenpaarextraktion (Königsberg & Henderson, 1983)

Die lyophilisierte, SDS-haltige Probe wurde in einer Mischung aus:

Aceton	85 Teilen
Triethylamin	5 "
HOAc	5 "
H ₂ O	2,5 "

aufgenommen und durch kurzes Beschallen gelöst; das Volumen wurde so gewählt, daß die SDS-Konzentration der gelösten Probe 10 mg/ml nicht überstieg. Das Protein wurde anschließend durch 20 min Inkubation bei 0°C ausgefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal bei 0°C mit Aceton gewaschen und nach dem Trocknen in 100 μl 0,1 % SDS gelöst.

4.2 Amidoschwarzbestimmung (Heil & Zillig, 1970)

Die auf Celluloseacetatstreifen aufgetragenen Proben- und Eichkurvenpunkte wurden 3 min in Amidoschwarzlösung angefarbt, anschließend mit destilliertem Wasser abgespült und dreimal für 7 min in den Entfärber gelegt, um den Hintergrund unspezifischer Anfärbung soweit wie möglich zu verringern.

Amidoschwarzlösung:	Amidoschwarz	250 mg
	Methanol	45 ml
	H ₂ O	45 ml
	HOAc	10 ml

Entfärber:	Methanol	90 ml
	HOAc	2 ml
	H ₂ O	2 ml

Die proteinhaltigen Flecken wurden ausgestanzt und mit je 1 ml Auflöser 20 min bei Raumtemperatur heftig geschüttelt.

Auflöser:	Trichloressigsäure	10 g
	HOAc	80 ml
	HCOOH	5 ml
	H ₂ O	20 ml.

Nach Auflösung des Celluloseacetats wurde die Extinktion der Proben bei 630 nm vermessen.

4.3 Herstellung von Proteinextrakten

4.3.1 Gesamtprotein aus *E. coli*

Für die Herstellung von *E. coli*-Gesamtproteinextrakten wurden entweder 10 ml LB-Kultur abzentrifugiert oder Kolonien von Agarplatten mit ca. 5000 Kolonien pro Platte abgeschabt und in 300 μ l TE-Puffer mit 0,2 mM PMSF resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 250 μ l 0,5 M SDS-Lösung lysiert und 30 min bei 60°C inkubiert. Nucleinsäuren wurden durch Beschallen zerstört, anschließend in SDS unlösliche Anteile abzentrifugiert (SS34-Rotor, 20 min bei 20 000 rpm, 15°C).

4.3.2 Proteinextrakte aus *Halobacterium halobium*

Cytoplasmatische Proteine und Membranfraktionen aus Halobakterien wurden gewonnen, indem 35 ml einer spätlogarithmischen Kultur abzentrifugiert und in 1 ml Wasser lysiert und resuspendiert wurden. Nucleinsäuren wurden auch hier durch Beschallen zerstört. Die Abtrennung cytoplasmatischer Anteile von Membranbestandteilen erfolgte anschließend durch Ultrazentrifugation des Lysates.

Membranfraktionen wurden durch Aufarbeitung des bei der Zentrifugation anfallenden Niederschlages gewonnen. Der Niederschlag wurde einmal mit 0,1 M NaCl gewaschen und anschließend mit 10 mM Tris-Puffer pH 6,8/ 3 % SDS/ 1 % β -Mercaptoethanol extrahiert.

5. Isolierung von DNA

5.1 Plasmide aus *E. coli*

5.1.1 Präparative Isolierung

Präparationen von Vektoren oder rekombinanten Plasmiden aus *E. coli* im größeren Maßstab wurden zu Beginn der Arbeit nach Oertel et al. (1977), später nach der Vorschrift von Katz et al. (1973) durchgeführt. Hierzu wurden 1 l amplifizierter Übernachtskultur abzentrifugiert und bei 0°C in 25 ml

Lösung A:	Tris-HCl pH 8,0	50 mM
	Sucrose	20 %

resuspendiert. Anschließend wurden 3 ml

Lösung B:	10 mg/ml Lysozym in	
	Tris-HCl pH 8,0	25 mM

zugefügt. Nach exakt 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 3 ml

Lösung C:	Na ₂ EDTA	250 mM
-----------	----------------------	--------

und 30 ml

Lösung D:	Tris-HCl pH 8,0	50 mM
	EDTA	25 mM
	Triton X-100	0,2 %

zugefügt und kurz und kraftig gemischt. Die Mischung wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 30000 rpm

20 min lang bei 20°C zentrifugiert (Ti 60-Rotor). Der Überstand des "cleared lysate" wurde mit 1 g CsCl und 50 µl Ethidiumbromidlösung pro ml Lysat versetzt und 20 h bei 42000 rpm (TV 850-Rotor) zentrifugiert. Die Plasmidbande wurde mit einer Einmalspritze seitlich abgenommen und bei 56000 rpm (TV 865-Rotor) erneut zentrifugiert. Die wieder seitlich abgezogene Plasmidbande wurde mit 2 Volumen TE-Puffer verdünnt und das Ethidiumbromid durch fünf Extraktionen mit TE-gesättigtem Isobutanol entfernt. Nach Zufügen von LiCl/EtOH, 4 Stunden Inkubation bei 0°C, Zentrifugation und Trocknen wurde die Plasmid-DNA in 400 µl TE-Puffer aufgenommen.

5.1.2 Minipräparationen

Die Minipräparationen von E. coli-Plasmiden wurden nach einer durch E. Beck (Heidelberg) modifizierten Vorschrift der Methode von Birnboim & Doly (1979) durchgeführt. Dafür wurden je 1 ml Übernachtskultur eine Minute in der Eppendorffzentrifuge pelletiert und der Niederschlag in 100 µl Lösung E aufgenommen.

Lösung E:	Tris-HCl pH 8,0	25 mM
	Glucose	50 mM
	EDTA	10 mM

Die resuspendierten Zellen wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann vorsichtig mit 150 µl Lösung F gemischt:

Lösung F:	NaOH	200 mM
	SDS	1 %

Das Lysat wurde 5 min in Eis gekühlt und die DNA durch Zugabe von 120 µl eiskalter Lösung G gefällt (vorsichtig schütteln).

Lösung G:	NaOAc	3 M
	CH ₃ COOH	2 M

Nach 2 min Zentrifugation wurde der Überstand einmal gründlich mit Phenol/TE, einmal mit Chloroform extrahiert und die DNA schließlich durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol gefällt. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das präzipitierte Material 2 min abzentrifugiert und noch zweimal mit Ethanol gewaschen.

Die so präparierten Plasmide waren als Substrate z.B. für Restriktionsenzyme und DNA-Polymerase I geeignet. Zur Analyse von kleinen DNA-Fragmenten mußte noch eine RNase-Behandlung angeschlossen werden.

5.2 DNA aus filamentösen Bakteriophagen

5.2.1 Präparative Isolierung

Für die Isolierung größerer Mengen M13mp-RF-DNA wurde ein Liter Vollmedium mit 20 ml einer stationären Kultur *E. coli* BMH 71-18 3 Stunden bei 37°C und 150 rpm inkubiert, anschließend durch Zugabe von 10 ml 1 M CaCl₂-Lösung 1 mM an Ca²⁺ eingestellt und mit ca. 10¹² Bakteriophagenpartikeln infiziert. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 150 bis 200 rpm inkubiert. Die Isolierung der RF-Form der Bakteriophagen erfolgt analog der Plasmidisolierung (III.5.1.1).

5.2.2 Minipräparationen von RF-DNA

Die Isolierung von RF-DNA aus kleineren Volumina wurde genau so wie die Minipräparationen von Plasmid-DNA durchgeführt.

5.2.3 Isolierung von Einzelstrang-DNA

Für die Einzelstrangpreparation für die Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) wurden ausgestochene Phagenplaques mit 3 Tropfen frischer Wirtsbakterien in 5 ml LB-Medium 5 bis 7 Stunden bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Nach dieser Zeit wurden ca. 1,5 ml der Kultur in Eppendorfgläsern 5 min abzentrifugiert. Vom Überstand wurde 1 ml in ein zweites Eppendorfglas pipettiert und dieses wie oben zentrifugiert. Vom Überstand dieser zweiten Zentrifugation wurden 800 µl in ein drittes Gefäß überführt und mit 200 µl Lösung H versetzt:

Lösung H:	2,5 M NaCl
	20 % PEG 6000

Die Mischung wurde 15 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min (Eppendorfsentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation erst mit einer normalen, anschließend mit einer ausgezogenen Pasteurpipette sorgfältig abgenommen und das Pellet in 110 µl Lösung I resuspendiert:

Lösung I:	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM pH 8,0.

Die Suspension wurde 2 x mit 100 µl Phenol/TE und einmal mit 100 µl CHCl₃/Isobutanol extrahiert (jeweils nur ca. 5 sec), und von der wässrigen Phase wurden 80 µl in ein frisches Eppendorfglas überführt.

Diesen 80 µl wurden 20 µl 5 M NaClO₄ und 50 µl Isopropanol zugefügt, kurz gemischt und dann 15 min in der Eppendorfsentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in 30 µl Lösung K aufgenommen.

Lösung K:	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	0,1 mM pH 8,0.

5.3 Isolierung von halobakterieller DNA

5.3.1 Gesamt-DNA

Die Halobakterien-DNA wurde isoliert wie bereits beschrieben in (Vogelsang et al., 1983). Aerob gewachsene Halobakterienkultur (0,7 l) der $OD_{578}=1.0$ (späte logarithmische Phase) wurden durch 15 min Zentrifugation bei 8000 rpm (GS3-Rotor) geerntet und anschließend in 3 ml Basalsalz resuspendiert. Die Zellsuspension wurde tropfenweise in 75 ml Lysepuffer eingerührt und für 2 Stunden bei 60°C inkubiert.

Lyse-Puffer:	Tris-HCl pH 8,2	100 mM
	Na ₂ EDTA	1 mM
	Na-Laurylsarcosinat	3 % (w/v)
	Pronase	200 µg/ml

Das Lysat wurde dreimal mit Phenol extrahiert und die DNA anschließend aus der wässrigen Phase mit LiCl/Ethanol gefällt. Sie wurde auf Glasstäbe aufgewickelt und einmal mit 70%igem Ethanol, zweimal mit Ethanol p.A. gewaschen und dann im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Nach dem Lösen in 30 ml TE-Puffer wurde die DNA 90 min bei 60°C mit 75 µg/ml pankreatischer RNase inkubiert, daraufhin wiederum dreimal phenolextrahiert und gefällt. Die getrocknete DNA wurde in 20 ml TE-Puffer gelöst und mit exakt 1,3 g CsCl/ml bei 40000 rpm (Ti 60) und 20°C 40 Stunden lang zentrifugiert. Der Gradient wurde fraktioniert und die OD_{260} der einzelnen Fraktionen bestimmt. Die DNA-haltigen Fraktionen wurden mit 5 Volumen TE-Puffer verdünnt, mit LiCl/Ethanol gefällt und das Präzipitat in 10 ml TE-Puffer aufgenommen.

5.3.2 Isolierung chromosomaler DNA ohne Plasmidanteile

Die GC-reichere Fraktion chromosomaler DNA wurde gewonnen, indem die wie oben beschrieben isolierte Gesamt-DNA einer weiteren Gleichgewichtszentrifugation in Anwesenheit von Bisbenzimid unterworfen wurde. Die über CsCl-Gradienten vorgereinigte DNA wurde erneut in TE-Puffer gelöst und mit 1,3 g CsCl/ml versetzt. Anschließend wurden 10 µg Bisbenzimid/ml zugesetzt und die DNA 40 h bei 32000 rpm (Ti 50) zentrifugiert. Dem Gradienten wurde die bei Belichtung (366 nm) stark fluoreszierende Bande chromosomaler DNA seitlich mit einer Einmalspritze abgenommen und, wie für Ethidiumbromid-gefärbte DNA beschrieben, durch Ausschütteln mit Isobutanol vom Bisbenzimid befreit.

5.3.3 Isolierung von Halobakterien-Plasmiden

Die Plasmidisolierung von halobakteriellen Plasmiden wurde durchgeführt wie von Pfeifer et al. publiziert (1981). Dafür wurden Zellen aus der spätlogarithmischen Phase 30 min bei 8000 rpm abzentrifugiert und in 0.5 Volumen Basalsalz resuspendiert. Die Suspension wurde auf 0°C gekühlt und Natriumdesoxycholat bis zu einer Endkonzentration von 7 mM zugefügt. Nach 45 min Inkubation bei 0°C wurden Membranbestandteile und ein Großteil der chromosomalen DNA durch 60 min Zentrifugation bei 8000 rpm entfernt. Der klare Überstand wurde mit 2 Volumen Wasser verdünnt und PEG 6000 bis zu einer Endkonzentration von 10 % darin gelöst. Nach 12 - 16 h Inkubation bei 0°C wurden die Plasmid - PEG - Komplexe 45 min bei 8000 rpm abzentrifugiert und der Niederschlag in 5% des Ausgangsvolumens TE - Puffer aufgenommen. Die Lösung wurde mit CsCl bis zu einer Endkonzentration von 1 g/ml versetzt und 2 aufeinanderfolgenden Gleichgewichtszentrifugationen unterworfen. Die Entfernung des Ethidiumbromides erfolgt genau so, wie für *E. coli* - Plasmide beschrieben (siehe 5.1.1)

5.4 Reinigung von DNA über Sucrosegradienten (Maniatis et al., 1978)

Über CsCl-Gradienten vorgereinigte DNA wurde über Sucrosegradienten nachgereinigt, um den Einbau von [^{32}P] markierten Verbindungen bei Nicktranslationen oder 5'-Markierungen der DNA mit Polynucleotidkinase zu verbessern, oder um Restrictionsfragmente verschiedener Größe voneinander zu trennen.

Aufbau des neutralen Sucrose-Gradienten:

Lösungen: 5% bzw. 20% und 60% Sucrose (w/v) in

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	1 M
EDTA	1 mM
Ethidiumbromid	1 $\mu\text{g/ml}$

In TST 41 Polyallomeröhrchen wurde ein Polster von 2 ml 60%iger Sucroslösung, darauf ein kontinuierlicher Gradient von 20 % bis 5 % Sucrose gegossen. Die DNA (nicht mehr als 150 $\mu\text{g/Röhrchen}$) wurde vorsichtig auf den Gradienten geschichtet und die Proben anschließend für 3 bis 6 Stunden (in Abhängigkeit von der Größe der DNA) bei 35000 rpm im TST 41 Ausschwingrotor zentrifugiert.

6. Homopolymerligation

Die nicht enzymatische Ligation von DNA mit Homopolymerketten wurde mit je 10 nMol poly(dC)getailtem Plasmid und äquimolaren Mengen poly(dG)getailten chromosomalen DNA-Fragmenten durchgeführt. Die beiden Bestandteile wurden miteinander gemischt und mit sterilem Hybridisierungspuffer

auf 100 μ l aufgefüllt.

Hybridisierungspuffer:	NaCl	0,15 M	
	Tris-HCl	0,01 M	
	EDTA	1 mM	pH 7,6.

Die DNA wurde 1-2 Stunden bei 57-58°C im Wasserbad inkubiert (Peacock et al., 1981) und anschließend auf Eis gestellt.

7. Enzymatische Reaktionen am Substrat DNA

An dieser Stelle wird nur auf die Reaktionsbedingungen bzw. die Herkunft der Rezepte für solche Enzyme verwiesen, die häufig in wechselnden Zusammenhängen, aber unter vergleichbaren Bedingungen eingesetzt worden sind.

7.1 T4-DNA-Ligase

Die DNA-Ligase wurde im vom Hersteller empfohlenen Puffer eingesetzt. Inkubationen von DNA mit Ligase erfolgten grundsätzlich mindestens über Nacht bei 50°C.

7.2 T4-Polynucleotid-Kinase

Für 5'Markierungen von DNA, Linkern oder Oligonucleotiden wurden die Arbeitsvorschriften aus dem Buch "Molecular Cloning" von T. Maniatis unmodifiziert übernommen.

7.3 Restrictionsendonucleasen

Restrictionsverdaus wurden in der Regel mit 2 U Enzym/ μg DNA für 2 Stunden bei der angegebenen Temperatur im vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt.

7.4 DNA-Polymerase I für Nicktranslation

Nicktranslationen wurden nach der Vorschrift von Rigby et al. (1977) durchgeführt, allerdings mit erhöhten Nucleotid- und Pufferkonzentrationen. Für die Reaktion wurden eingesetzt:

DNA		0,2 bis 0,5 μg
$[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$		
(3000 Ci/mMol)	25 bis 50 μCi	
5xNicktranslations-		
puffer	20 μl	
H_2O	ad	95 μl
Kornberg-		
polymerase 25 U	5 μl	

		Endkonzentration im Nicktranslationsansatz
5xNicktranslationspuffer		
Tris-HCl	0,5 M	100 mM
MgCl_2	50 mM	10 mM
dTTP	0,5 mM	100 μM
dGTP	0,5 mM	100 μM
dATP	0,5 mM	100 μM
	pH 7,5	

Nach 3 h Inkubation bei 18°C wurden in Abhängigkeit von der Reinheit der eingesetzten DNA Einbau von max. 10^8 cpm $[\alpha^{32}\text{P}]/\mu\text{g}$ DNA gemessen.

7.5 Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I

Das Klenowfragment der Polymerase I wurde zum einen in der Sequenzierung nach Sanger benutzt, zum anderen zum Auffüllen von 5'überstehenden Enden nach Endonucleasebehandlung. Die Bedingungen für die Polymerasereaktion bei der Didesoxymethode wurden unmodifiziert aus dem Amersham-Protokoll übernommen. Für das Auffüllen von "sticky ends" ist nachfolgend ein Modellansatz beschrieben:

Reaktionsansatz:

Plasmid-DNA	5	μg	
Klenow-Mix (-dTTP)	7,5	μl	
0,1 mM dTTP	8	μl	0,8 nMol
[^3H]-dTTP (50 Ci/mMol)			
getrocknet	10	μCi	0,2 nMol
H_2O	18,5	μl	
Klenow-Polymerase (5 U)	1	μl	
Gesamtvolumen	50	μl	

Klenow-Mix (-dTTP)	Tris-HCl	0,5	M	
	MgCl_2	10	mM	
	dATP	0,5	mM	
	dGTP	0,5	mM	
	dCTP	0,5	mM	pH 7,5.

Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Parallel zur Reaktion wurden zu den Zeitpunkten $t = 0$ min, 10, 20, 30, 45, 60 und 75 min der [^3H] dTTP-Einbau durch Messung des säurefällbaren Materials bestimmt. Die Reaktion wurde nach 75 min durch Zugabe von 1 μl 0,5 M EDTA beendet. Nicht umgesetztes [^3H] dTTP wurde vom Produkt durch Gelfiltration abgetrennt.

Säulenmaterial: Sephadex G 75 in TE-Puffer

Bettvolumen: 10 ml

Fraktionsgröße: 10 Tropfen

Von jeder Fraktion wurden 2x2 µl abgenommen und parallel erstens direkt in Szintillator pipettiert, zum andern nach Säurefällung ausgezählt.

7.6 Nuclease Bal 31 (Gray et al., 1975)

Nuclease Bal 31 wurde zur Herstellung verschiedener Deletionsmutanten eingesetzt. In allen Versuchen war das vom Hersteller empfohlene Verhältnis von Plasmid zu Puffervolumen und Einheiten Enzym konstant, während die Größe der Ansätze variierte.

Linearisiertes Plasmid	30 µg
Bal 31-Puffer (Biolabs)	45 µl
Bal 31-Nuclease 1 U	0,4 µl

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils Proben entnommen und in 9 Volumen eines auf 0°C vorgekühlten Puffers pipettiert, der zur Inaktivierung des Bal 31 5 mM an EGTA war und ansonsten dem Puffer desjenigen Restriktionsenzymes entsprach, dessen Einsatz im nächsten Schritt vorgesehen war.

7.7 Exonuclease III

Exonuclease III wurde stets in *Bam* H I-Puffer eingesetzt.

<i>Bam</i> H I-Puffer:	Tris-HCl	6 mM	
	KCl	20 mM	
	MgCl ₂	6 mM	
	Dithiothreitol	6 mM	pH 7,5.

7.8 Terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT)

Terminale Desoxynucleotidyltransferase wurde zum einen zur Markierung von Oligodesoxynucleotiden eingesetzt, zum anderen zum Anfügen von poly(dG) bzw. poly(dC)-Ketten an doppelstrangige DNA (Rouchoudhury et al., 1976; Efstradiatis & Villa-Komaroff, 1979). Die Bedingungen für die drei Reaktionen unterschieden sich jeweils geringfügig.

(a) 3' Terminale [^{32}P]-Markierung des Oligonucleotides

40 pMol des 14mers 5'CTGGGCCTGCGATA3' wurden in 100 μl folgenden Puffers (TdT-Oligo-Puffer) gelöst:

Natrium-Cacodylat	100 mM
Kaliumphosphat	7,5 mM
MgCl ₂	8 mM
Dithiothreitol	0,2 mM
CoCl ₂	0,5 mM
BSA	150 $\mu\text{g/ml}$

Nach Zugabe von 5 μM [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (500 Ci/mMol) und 30 U Terminaler Desoxyribonucleotidyltransferase wurde das Reaktionsgemisch für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μl 1 M EDTA gestoppt und nicht eingebautes radioaktives Triphosphat vom Produkt durch Filtration über eine Sephadex G 25-Säule (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA) getrennt.

(b) Verlängerung von linearisiertem Plasmid mit poly(dC)

Für die Verlängerung einer DNA mit einer bestimmten Anzahl von (dC)-Resten wurde zuerst in einem Vorversuch eine Kinetik aufgenommen, deren Bedingungen anschließend im präparativen Ansatz proportional verändert wurden. Reaktionsansatz:

linearisiertes Plasmid

m. aufgefüllten Enden	2 μg	entspricht	2 pMol
[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP	30 μCi	entspricht	10 pMol
10xCacodylat-Puffer (+C)	10 μl		
H_2O	89 μl		
TdT 10 U	1 μl		

Gesamtvolumen 100 μl

10xCacodylatpuffer (+C)	Cacodylsäure	2 M
	CoCl_2	10 mM
	Tris-HCl	250 mM
	BSA	1 mg/ml
	dCTP	1 mM
	Dithiothreitol	2 mM
	mit KOH	pH 6,9.

Die Reaktionen wurden bei 37°C durchgeführt. Für die Kinetik wurden zu den Zeitpunkten $t = 0$ min, 1, 2,5, 5, 10, 20, 30, 45 und 60 min je 10 μl (entspricht 0,2 μg) entnommen, mit Säure gefällt und über Glasfaserfilter filtriert. Der Verlauf der Reaktion des präparativen Ansatzes wurde durch Entnahme von je 0,2 μg zu den Zeitpunkten $t = 0$ min, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 105 und 135 min verfolgt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl 0,5 M EDTA abgestoppt. Radioaktiv markiertes Plasmid wurde von nicht umgesetzten [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP durch Gelfiltration abgetrennt.

Säulenmaterial: Sephadex G 75

Bettvolumen: 10 ml

Fraktionsgröße: 10 Tropfen

Produkthaltige Fraktionen wurden durch Cerenkov-Messung identifiziert und mit LiCl/EtOH gefällt.

(c) Anfügen von poly(dG)-Ketten an chromosomale Fragmente

Präparativer Reaktionsansatz:

*A**lu* I-Fragmente

(ca. 1500 bp)	3,5 µg	entspricht 7 pMol
10x α Cacodylpuffer (-dNTP)	10 µl	
5 mM dGTP	2 µl	entspricht 10 nMol
[α^{32} P]-dGTP		
(3000 Ci/mMol) 75 µCi	7,5 µl	
H ₂ O	80 µl	
TdT 10 U	1 µl	
	100 µl	

Die Reaktion wurde bei 37°C durchgeführt. Zu den Zeitpunkten $t = 0$ sec, 90 sec, 150 sec, 5 min, 10, 20, und 30 min wurden je 0,25 pMol entnommen und saurefallbares Material bestimmt. Die Reaktion wurde nach 30 min durch 10 µl 0,5 M NaEDTA gestoppt und DNA von freien radioaktiven Triphosphaten abgetrennt.

Säulenmaterial: Sephadex G 75 in TE-Puffer

Bettvolumen: 10 ml

Fraktionsgröße: 20 Tropfen

7.8.1 Ribonuclease A

Für die RNasebehandlung von Präparationen chromosomaler DNA oder Plasmidminipräparationen wurde eine Stammlösung mit 10 mg/ml hergestellt und für 10 min bei 80°C vorinkubiert. Chromosomale DNA wurde mit 75 µg/ml 90 min bei 60°C inkubiert, DNA aus Plasmidminipräparationen nach dem Verdau mit der jeweiligen Restrictionseendonuclease mit 1 µl der Stammlösung 30 min bei 56°C.

7.8.2 Alkalische Phosphatasen

Sowohl die bakterielle alkalische Phosphatase als auch die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm wurden genau nach der Vorschrift aus "Molecular Cloning" von Maniatis et al. eingesetzt.

7.8.3 Lysozym siehe III.9.3.2

7.8.4 Pronase siehe III.5.3.1

8. Elektrophorese von Nucleinsäuren und Proteinen

8.1 DNA - Elektrophoresen

8.1.1 Nicht-denaturierende Agarosegele für DNA

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 bis 2%ige Agarosegele in Loeningpuffer (Loening, 1969) verwendet. Die Elektrophoresen wurden über Nacht bei 2,5 V/cm für Flachbettgele von 20 x 20 cm, oder 1 h bei 8 V/cm für Gele von 4 x 6 cm (Minigele) durchgeführt. Die aufgetragene DNA-Menge variierte zwischen 15 µg (chromosomale DNA) und 1 µg (ungespaltene Plasmid-DNA) pro Bahn eines normalgroßen Geles; für präparative Gele wurden mehrere Zähne eines Kammes durch Klebestreifen verbunden, um Taschen mit größerem Fassungsvermögen zu erhalten. Auf Minigelen konnten noch 20 bis 50 ng DNA sichtbar gemacht werden. Alle Proben wurden vor dem Auftrag mit mindestens 10 % (v/v) eines Probenpuffers mit Farbmärker versetzt.

Probenpuffer: 50 % Saccharose
 0,1 % Bromphenolblau
 in TE-Puffer

Loeningpuffer: Tris-Essigsäure 0,36 M
 NaH_2PO_4 0,3 M
 Na_2EDTA 0,01 M pH 7,8.

Die DNA-Fragmente wurden 15 min in Ethidiumbromidbädern (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) angefärbt und nach mehrmaligem Abspülen unter fließendem deionisierten Wasser durch Anregung bei 302 nm (Durchlicht; Chroma 43) oder 254 nm (Auflicht; Desaga) sichtbar gemacht. Aufnahmen wurden unter Verwendung eines Rotlichtfilters (590 nm, Heliopan, Gräfelfing) unter Verwendung von 27 DIN-Filmen (Ilford HP 5) gemacht. Belichtungsbedingungen: Blende 5,6; 2 min, 1 min und 0,5 min.

8.1.2 Polyacrylamid-Harnstoffgele (Maxam & Gilbert, 1977)

Für die Analyse von Oligodesoxyribonucleotiden und zur Sequenzierung von DNA wurden 20 x 40 cm Polyacrylamid-Harnstoffgele unterschiedlicher Stärke und Acrylamidkonzentration verwendet. Für die präparative Isolierung von Oligonucleotiden wurden 1 mm dicke Spacer benutzt, Sequenzierungsgele waren dagegen nur 0,2 mm dick.

Die nachstehende Tabelle gibt die Zusammensetzung 8%iger bzw. 20%iger Gele für je 100 ml Gel Flüssigkeit an:

	8% AA	20% AA
Harnstoff	42,0 g	42,0 g
29% Acrylamid, 1% N,N-Methylenbisacrylamid	10,7 ml	26,7 ml
H_2O ad	89,5 ml	89,5 ml
10 x TBE-Puffer	10 ml	10 ml
TEMED	50 μl	50 μl
Peroxodisulfat (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	0,5 ml	0,5 ml

8.2 RNA-Elektrophorese in Formaldehyd-Agarose-Gelen (Lehrach et al., 1977)

RNA-Gele wurden in 12 x 12 cm großen Flachbettgelapparaturen mit 8 V/cm bei Raumtemperatur gefahren (Agarose-konzentration: 1,5 %).

10xGelpuffer:	MOPS	200 mM	
	NaAc	50 mM	
	EDTA	10 mM	pH 8,0.

10xLaufpuffer: genauso, aber pH = 7,0.

Probenpuffer:	Formamid, deionisiert	250 μ l
	Formaldehyd 36 %	83 μ l
	10xGelpuffer	50 μ l

Farbstoffmischung:	Ficoll	25 %
	Bromphenolblau	0,3 %
	Xylencyanolblau	0,3 %

RNA-Gele, die für einen Northern-Blot bestimmt waren, wurden mit ca. 0,3 μ g über einen Sucrosegradienten gereinigter mRNA beladen. Die RNA wurde in Wasser gelöst bis zu einer Endkonzentration von ca. 0,2 μ g/10 μ l und anschließend im Verhältnis 2 : 9 : 1 mit Probenpuffer und Farbstoffmischung versetzt. Unmittelbar vor dem Auftragen wurde die Probe durch 5minütiges Erhitzen auf 70 - 80°C denaturiert, dann sofort in ein Eisbad gestellt.

8.3 Gelelektrophorese von Proteinen

8.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gradientengele (Laemmli, 1970)

Die Elektrophoresen wurden in Plattengelapparaturen mit 1,5 mm dicken Gelen (12x13 cm) bei 15 mA/135 V über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit Färbelösung 1 Stunde lang angefärbt, dann solange wie notwendig entfärbt.

Stammlösungen:

1. Tris-HCl pH 8,8	1 M
2. Tris-HCl pH 6,8	1 M
3. Acrylamid	50 %
N,N'-Methylenbisacrylamid	1,3 %
4. N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	5 %
5. SDS	10 %
6. Ammoniumperoxodisulfat	15 mg/ml

Für 9-24%ige Gradientengele wurden folgende Mischungen hergestellt:

	9 %	24 %	Obergel
Tris-HCl pH 8,8	4,55 ml	4,55 ml	---
Tris-HCl pH 6,8	---	---	1,36 ml
H ₂ O	5,00 ml	1,5 ml	4,4 ml
Acrylamid/Bis	2,16 ml	5,8 ml	0,8 ml
TEMED	0,19 ml	0,06 ml	0,12 ml
SDS	0,11 ml	0,11 ml	0,12 ml
APS	0,10 ml	0,10 ml	0,40 ml

Färbelösung:	2,2 g	Coomassie Blue R 250
	80 ml	CH ₃ COOH
	500 ml	CH ₃ OH
	420 ml	H ₂ O
Entfärbelösung:	70 ml	CH ₃ COOH
	100 ml	CH ₃ OH
	830 ml	H ₂ O
Probenpuffer:	34 ml	10 % SDS
	15 ml	1 M Tris-HCl pH 6,8
	50 ml	Glycerin
	1 ml	2-Mercaptoethanol
	8 ml	0,05 % Bromphenolblau
Elektrodenpuffer:	25 mM	Trisbase
	192 mM	Glycin
	0,1 %	SDS
Der Elektrodenpuffer wird als 10fach konzentrierte Stammlösung ohne SDS vorbereitet.		

Proteingele wurden mit Agfa Ortho 25 Filmen 1/4 sec bei Blende 11, 1/4 und 1/8 sec bei Blende 16 fotografiert.

8.3.2 Präparative Gelelektrophorese

(1) Plattengele

Die Isolierung des induzierbar exprimierten Proteins aus zwei der durch Immunoscreening selektionierten Clone erfolgte durch Auftragen von ca. 20 mg des bakteriellen Lysates (s. III.3.2) auf 3 mm dicke SDS-Gradienten-Gele (9 - 20 % Acrylamid) und Ausschneiden der entsprechenden Bande. Die Stammlösungen entsprechen den für die analytischen Gele verwendeten Lösungen. Für 9 - 20% Gele wurden folgende Mischungen hergestellt:

	9 %	20 %	Obergel
Tris-HCl pH 8,8	9,1 ml	9,1 ml	- -
Tris-HCl pH 6,8	- -	- -	1,02 ml
H ₂ O	10,3 ml	5,0 ml	6,45 ml
Acrylamid/Bis	4,4 ml	9,7 ml	0,60 ml
TEMED 5%	0,2 ml	0,06 ml	0,09 ml
SDS 10%	0,24 ml	0,24 ml	0,09 ml
APS 15 mg/ml	0,10 ml	0,10 ml	0,30 ml

Scharfe und gerade Banden waren mit diesem Gelsystem nur zu erzielen, wenn der Ausbildung des Gradienten mindestens 45 min Zeit gegeben wurde.

(2) Präparative Elektrophorese mit LKB Uniphor 7900

Zur Nachreinigung des nativ angereicherten Halorhodopsins, das als Antigen für die Immunisierung von Kaninchen verwendet werden sollte, wurde eine präparative Gelelektrophorese (Waehnelt, 1971) mit 10 mg Halorhodopsin durchgeführt. Dazu wurde die Proteinlösung auf eine thermostatisierte Acrylamidsäule mit 2 cm Durchmesser aufgetragen, deren unteres Ende während der Elektrophorese einem ständigen Pufferstrom ausgesetzt wurde. Auf diese Weise wurden alle im Laufe der Elektrophorese die Säule verlassenden Proteine im Kathodenpuffer fraktioniert.

Stammlösungen: jeweils ad 100 ml

A)	Trisbase	36,6 g
	HCl 1N	48 ml
	TEMED	0,46 ml
B)	Trisbase	5,7 g
	H ₃ PO ₄ 1M	25,6 ml
	TEMED	80 µl

C)	Acrylamid	48 g
	Bis	1,28 g
	$K_3[Fe(CN)_6]$	15 mg
D)	Acrylamid	10 g
	Bis	2,5 g
F)	Sucrose	50% (w/w)
P)	Ammoniumperoxodisulfat	14 mg/ml
S)	SDS	0,8 g

Zusammensetzung des Trenngeles mit 12% Acrylamid:

Lösung	A	C	S	P	Wasser
Volumen	5,72 ml	11,44 ml	5,72 ml	2,3 ml	20 ml

Das Trenngel wird nach dem Gießen vorsichtig mit einer Mischung aus:

1 Teil A
 2 Teilen S
 6 Teilen H_2O überschichtet.

Zusammensetzung des Obergelges mit 2,7% Acrylamid:

Lösung	B	D	F	S	P
Volumen	1 ml	2 ml	3 ml	1 ml	0,5 ml

Das Obergel wurde mit einer Mischung aus:

1 Teil B
 1 Teil S
 6 Teilen H_2O überschichtet.

Elektrophoresepuffer:

(1) Kathoden-Puffer: Trisbase 12,7 g
 Glycin 7,9 g
 SDS 2,0 g
 ad 2 Liter, pH 8,9.

(2) Anoden-Puffer: Trisbase 24,2 g
 HCl 1N 100 ml
 SDS 2,0 g
 ad 2 Liter, pH 8,1.

Die Elektrophorese wurde bei 70°C mit einer Anfangseinstellung von 6 mA und 200 V für 3 Stunden, dann über Nacht bei 12 mA und 1000 V durchgeführt.

Pumpgeschwindigkeit: 0,2 ml/min

Fraktionsgröße: 25 min = 5 ml

Fraktionierungsbeginn: nach 10 Stunden.

9. Transfer von Nucleinsäuren und Protein auf Nitrocellulose

9.1 Transfer von DNA

9.1.1 "Southern"-Blot (Southern, 1975): Übertragung von DNA aus Agarosegelen

1 bis 3 µg Plasmid-DNA oder 15 µg chromosomale DNA wurden nach der Spaltung mit der entsprechenden Restriktionsendonuclease durch Elektrophorese in einem horizontalen Agarosegel nach Größe aufgetrennt und nach der Anfärbung

neben einem Lineal fotografiert. Das Gel wurde zuerst 2x7 min in 0,25 M HCl, dann 2x15 min in 0,5 N NaOH/1,5 M NaCl und schließlich 2x15 min in 0,5 M Tris-HCl pH 7,5/1,5 M NaCl inkubiert. Im Fall der Analyse sehr kleiner Restrictionsfragmente wurde das saure Bad entweder auf die Hälfte verkürzt oder ganz ausgelassen. Die Übertragung auf Nitrocellulose (Schleicher & Schüll) erfolgte nach der Methode von Southern (1975) in 20xSSC bei Raumtemperatur. Der Filter wurde 2 Stunden bei 80°C gebacken, 2-4 Stunden bei 40°C vorhybridisiert (5 x SSPE, 100 µg/ml beschaltete, frisch denaturierte Kalbsthymus-DNA, 0,3 % SDS; Davis et al., 1980) und schließlich mit 15 ml frischen Vorhybridisierungspuffer in starke Plastikfolie eingeschweißt und für ca. 48 Stunden mit der nachtraglich injizierten hitzedenaturierten, radioaktiven Probe im Wasserbad geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen in 2 x SSPE + 0,2 % SDS für jeweils 15 min wurde das Nitrocelluloseblatt 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und autoradiographiert (Linhardt X-Ray 90-Film).

Hybridisierungsbedingungen:

(1) Hybridisierung mit nicktranslatierter DNA

Hybridisierungstemperatur 60°C, Waschtemperatur 60°C. Bei Hybridisierung mit Fragmenten, die GC-Homopolymerketten enthielten, wurden zur Hybridisierungslosung 100 µg/ml Polyribocytidylsäure gegeben.

(2) Hybridisierung mit Oligonucleotiden

Die Hybridisierungstemperatur für die Hybridisierung mit nicht entarteten Oligodesoxyribonucleotiden berechnet sich normalerweise nach folgender Formel:

$$(N_{G/C} \times 4 + N_{A/T} \times 2) - 10 = \text{Hybridisierungstemperatur}$$

Für das verwendete Oligonucleotid (C_n)CTGGGCCTGCGATA ergibt sich so eine Hybridisierungstemperatur von 41°C bis 53°C in Abhängigkeit von der Anzahl der durch

Terminale Desoxynucleotidyltransferase angefügten dC's. Hybridisierungen mit diesem Oligonucleotid wurden bei 45°C durchgeführt, die Waschttemperatur betrug 25°C. Bei der Hybridisierung von Oligonucleotiden mit poly-C-Ketten wurde ebenfalls mit 100 µg/ml Polyribocytidylsäure abgesättigt.

9.1.2 Koloniehybridisierung (Davis & Botstein, 1980)

Auf ampicillinhaltige LB-Platten mit ca. 90 in ein vorgegebenes Raster eingesetztes Transformanten wurde ein trockener Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schüll, Durchmesser: 82 mm) gelegt. Nach 2 min Adsorptionszeit wurden die Filter für weitere 24 Stunden auf chloramphenicolhaltigen Platten inkubiert. Die amplifizierten Kolonien wurden für die Koloniehybridisierung vorbereitet, indem sie zuerst mit der bewachsenen Seite nach oben gerichtet für 10 min auf 2 Lagen in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl getränktes Filterpapier (Whatman 3MM) überführt wurden, anschließend auf trockenem Filterpapier von überschüssiger Flüssigkeit befreit und 10 min auf 2 Lagen mit 0,5 M Tris-HCl pH 7,5/1,5 M NaCl getränktem Filterpapier neutralisiert wurden. Die auf 3MM-Papier zwischengetrockneten Filter wurden durch einstündiges Schütteln in CHCl_3 bei Raumtemperatur von Lipiden befreit, anschließend wurde die DNA durch zweistündiges Backen bei 80°C fixiert und die Filter wie für den Southernblot beschrieben weiter behandelt.

9.1.3 Dot-Blot

Je 1 µg isolierter Inserts der entsprechenden Plasmide in 10 µl TE-Puffer wurde mit gleichem Volumen 1 N NaOH versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurde mit 200 µl 0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl und 10 µl 1N HCl neutralisiert und dann sofort je 45 µl denaturierter DNA-Lösung unter Benutzung einer Minifold-Apparatur auf Nitrocellulose aufgetragen. Die

beladene Nitrocellulose wurde wie oben beschrieben gebacken, vorhybridisiert und dann hybridisiert.

9.2 Transfer von RNA (Thomas, 1983)

9.2.1 Northern-Blot

Die Übertragung von PNA aus nicht angefärbten Formamid-Gelen wurde analog den Southern-Blots in 20xSSC durchgeführt. Der Transfer wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Die beladene Nitrocellulose wurde getrocknet und 2 Stunden bei 80°C gebacken, bevor sie für mindestens 6 Stunden bei 42°C in sterilisiertem Northernpuffer vorinkubiert wurde.

Northernpuffer:	Formamid	50 %	
	5xSET	25 %	
	Beschallte DNA	100 µg/ml	
	H ₂ O	ad	100 %
20xSET:	Tris-HCl	1 M	
	NaCl	3 M	
	EDTA	20 mM	pH 7,8

Die eigentliche Hybridisierung fand im gleichen Puffer nach Hinzufügen von ca. 300 000 cpm [³²P]-markierter DNA pro Spur bei 42°C für 20 Stunden statt.

Der Northernblot wurde nach der Hybridisierung viermal 5 min bei Raumtemperatur mit 2xSSPE gewaschen, anschließend zweimal 15 min bei 50°C in 0,2xSSPE.

9.3 Transfer von Protein auf Nitrocellulose

9.3.1 Übertragung von Protein aus SDS-Polyacrylamidgelen (Westernblot; Towbin et al., 1979)

Protein aus SDS-Polyacrylamidgradienten-Gelen wurde elektrophoretisch auf Nitrocellulose übertragen. Dafür wurde das nicht angefärbte Gel sofort nach Beendigung der Elektrophorese zusammen mit einem Nitrocelluloseblatt gleicher Größe zwischen je 2 Lagen 3MM-Papier und eine Lage Scotch Britt in eine Western-Blot-Apparatur eingespannt.

Transferpuffer:	Trisbase	25 mM	
	Glycin	192 mM	
	Methanol	20 %	pH 8,3.

Die Übertragung wurde nach 2 Stunden bei 30 V und Raumtemperatur abgebrochen; im Gel verbliebenes Protein wurde mit Comassie angefarbt. Der Westernblot wurde mit 3 % BSA/5 % Nullserum (Kaninchenserum vor der ersten Immunisierung) in TBS abgesättigt (1 Stunde, 37°C) und anschließend mit einer Verdünnung des entsprechenden Antikörpers in TBS-Puffer 30 min bei 37°C inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde bei Raumtemperatur durch 3 Waschgänge mit TBS-Puffer von je 10 min entfernt. Im Falle nicht FITC-konjugierter Antikörper mußte eine weitere Inkubation mit FITC-markiertem Ziege-anti-Kaninchen Antikörper angeschlossen werden. Dessen Überschuss wurde wie oben beschrieben durch Waschen mit TBS-Puffer entfernt.

TBS-Puffer:	NaCl	0,15 M	
	Tris-HCl	10 mM	pH 7,3.

Der getrocknete Blot wurde mit Licht von 495 nm belichtet

und durch einen Orangefilter (Schott; OG 530) photographiert (Ilford HP 5, 27 DIN, Blende 5,6; 10 bis 15 sec).

9.3.2 Fixierung von *E. coli*-Kolonien auf Nitrocellulose für Immunoassays

Auf die Agarplatten mit den über Nacht angewachsenen Kolonien wurde ein steriler Nitrocellulosefilter aufgelegt und nach ca. 3 min vorsichtig abgezogen. Für Induktionsversuche wurde dieser Filter 5 Stunden bei 43°C auf frischen Platten unter Selektionsdruck nachinkubiert und die Kolonien anschließend lysiert, andernfalls sofort mit Lysozym behandelt. Dazu wurden die Filter für dreimal 2 min auf mit Lysozymlösung getränktes Filterpapier gelegt.

Tris/Lysozym:	Tris-HCl	10 mM	
	EDTA	1 mM	
	Lysozym	1 mg/ml	pH 8,0.

Die Filter mit den lysierten Kolonien wurden 15 min bei 100°C in 5 % SDS in PBS inkubiert; Zelldebris und DNA-Spuren wurden anschließend unter einem Strahl deionisierten Wassers abgespült.

PBS-Puffer:	NaCl	140 mM
	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM

Die Filter wurden in 3 % BSA, 0,5 % Nullserum vorinkubiert (1 Stunde bei Raumtemperatur), um unspezifische Bindung zu vermeiden, dann für 30 min mit dem entsprechenden Antikörper bei Raumtemperatur geschüttelt. Waschen und eventuell eine zweite Inkubation mit einem anti-Kaninchen Antikörper wurde durchgeführt wie für den Westernblot beschrieben.

10. Elution aus der Gelmatrix

10.1 Elution von DNA aus Agarosegelen

10.1.1 Elektroelution von DNA - Fragmenten (Yang et al., 1979)

Die gewünschten Fragmente wurden möglichst eng mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Dialyseschläuche gesteckt, die zuvor einmal mit 10 % Na_2CO_3 und fünfmal mit H_2O gründlich ausgekocht worden waren. Die Schläuche wurden mit 1xE-Puffer (s. u.) gefüllt und in Flachbettelektrophoresekammern gelegt. Die Elektroelution wurde in Abhängigkeit von der Fragmentgröße 20 min bis zu 3 Stunden bei 300 V in 1xE-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde nach Entnahme der Gelstückchen für 30 sec umgepolt, um die DNA von der Membran abzulösen. Die Lösungen der elektroeluierten Fragmente wurden durch Nitrocellulosefilter ($0,45 \mu\text{m}$) filtriert und phenolisiert, mit Chloroform extrahiert und schließlich mit 1/10 Volumen 10 M LiCl und 2,5 Volumen Ethanol p.A. 20 min bei -70°C gefällt.

10 x E-Puffer:	Trisbase	400 mM
	NaOAc	50 mM
	Na_2EDTA	10 mM
	pH mit konz. CH_3COOH auf 7,8 einstellen.	

10.1.2 Elution von Oligodesoxynucleotiden aus Polyacrylamid-Harnstoffgelen (Fritz et al., 1982)

Synthetische Oligodesoxynucleotide, die zu einem gewissen Prozentsatz trotz Vorreinigung über HPLC gegenüber dem gewünschten Produkt verkürzte Ketten enthielten, wurden präparativ von diesen Abbruchketten befreit, indem sie aus Polyacrylamid-Harnstoffgelen ausgeschnitten wurden. Dazu wurden auf 1 mm dicke 20%ige Gele (Zusammensetzung siehe 8.1.2) mindestens 500 pMol des Oligonucleotids aufgetragen und in Abhängigkeit von der Länge des erwarteten Produktes 3 - 6 h bei 25 W elektrophoretisiert. Die Nucleotide wurden durch Fluoreszenzloschung (Anregung 254 nm) auf PEI-Celluloseplatten mit Fluoreszenzindikator sichtbar gemacht. Die Banden wurden möglichst eng ausgeschnitten und in einem Eppendorfcap zermörsert. Die feinen Polyacrylamidstückchen wurden mit 500 µl 10 mM Tris/0,1 mM EDTA pH 8,0 gut gemischt und über Nacht bei 60°C inkubiert. Die Polyacrylamidfragmente wurden anschließend 10 min in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet nochmals mit 500 µl Puffer gewaschen. Beide Überstände wurden auf 1 ml aufgefüllt, mit 8 µg beschallter Kalbsthymus-DNA versetzt und erneut zentrifugiert. Von den Überständen wurden viermal 225 µl Puffer abgehoben und zweimal mit Phenol/TE, zweimal mit CHCl_3 extrahiert und anschließend noch einmal zentrifugiert. Aus den Überständen wurden die Oligodesoxynucleotide nach Zugaben von 1/10 Volumen 3 M NaAc und 3 Volumen EtOH 20 min bei -70°C gefällt.

10.2 Elution von Proteinen

10.2.1 Elektroelution mit LKB Multiphor 2117

Aus einem wie üblich angefarbten und entfärbten präparativen Plattengel ausgeschnittene Proteinbanden wurden in ein Agarosebett eingegossen und bei 7°C und 15 W in ein 2 cm breites Bett HA-Ultrogel elektrophoretisiert.

Puffer für Agarose und Ultrogel:	Tris-Glycin	0,1 M
	SDS	0,1 % pH 9,1

Elektrophoresepuffer:	Tris-Glycin	0,1 M
	SDS	0,1 % pH 9,1

Nach ca. 2 Stunden Elektrophorese wurde das Ultrogel in einen G 3-Fritte überführt und Protein mit 0,5 M Phosphatpuffer pH 6,8/0,1 % SDS eluiert. Die proteinhaltige Lösung wurde eingeeengt (Amicon-Zelle) und zweimal mit 0,05 % SDS in Wasser gewaschen. Nach erneuter Konzentration wurde das Protein lyophilisiert und zur Entfernung von SDS und Comassie-Farbstoff einer Ionenpaarextraktion (s. III.4.1) unterworfen. Die Probe wurde anschließend in 0,1 % SDS aufgenommen und der Proteingehalt durch eine Amidoschwarzbestimmung (s. III.4.2) festgestellt.

11. Gewinnung von Antikörpern

11.1 Immunisierung (Johnston & Thorpe, 1982)

Für die Produktion von Antikörpern wurden Kaninchen nach einem Standardverfahren immunisiert. Die Grundimmunisierung erfolgte durch subcutane Injektion von 200-250 μg Protein in 2 ml 0,1 % SDS, das 1:1 mit komplettem Freund'schen Adjuvans gemischt worden war. Nach 4 Wochen wurde dreimal in wöchentlichen Abständen mit je 50 μg Protein in 500 μl 0,1 % SDS, gemischt mit dem gleichen Volumen inkomplettem Freund'schen Adjuvans, geboostert. 1 Woche nach dem letzten Boostern wurden dem Kaninchen ca. 40 ml Blut aus einer Ohrvene entnommen.

11.2 Serumgewinnung

Das entnommene Blut wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur, dann über Nacht bei 20°C inkubiert. Anschließend wurde das Serum von den aggregierten Fibrin-Bestandteilen getrennt und sowohl der Blutkuchen als auch das Serum 1 Stunde bei 3000 rpm in einer Hettich-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt.

11.3 IgG-Anreicherung durch Affinitätschromatographie (Ey et al., 1978)

Die Immunglobuline wurden aus dem Serum durch Zufügen von gesättigter Ammoniumsulfatlösung (Endkonzentration: 45 % Sättigung) gefällt und abzentrifugiert (20 min, 10°C, 10000 rpm). Das feuchte Pellet wurde aufgenommen in:

Säulenpuffer:	Natriumphosphatpuffer pH 8,0	0,1 M
	NaN ₃	0,1 %

Die Fällung wurde einmal wiederholt und das entstandene Pellet in ein Drittel des Ausgangsvolumens Säulenpuffer aufgenommen. Das Material wurde auf eine Protein A-Sepharose-Säule aufgetragen und die Absorption des Eluates bei 278 nm detektiert.

Säulenvolumen: 10 ml

Flußgeschwindigkeit: 12 ml/h

Fraktionsgröße: 10 min/Fraktion

Elutionsmittel: 150 ml Säulenpuffer (s.o.), anschließend:

Desorption der IgG's: 50 ml Desorptionspuffer.

Desorptionspuffer:	CH ₃ COOH	0,1 M
	NaCl	0,15 M

Die proteinhaltigen Fraktionen des Desorptionsschrittes wurden mit NaOH neutralisiert und zweimal wie oben beschrieben mit Ammoniumsulfat gefällt.

11.4 FITC-Markierung der IgG-Fraktion (Goding, 1976)

Die angereicherte IgG-Fraktion wurde nach der Ammoniumsulfatfällung in FITC-Reaktionspuffer (50 % des Ausgangsvolumens) aufgenommen:

FITC-Reaktionspuffer:	NaCl	0,1 M
	NaHCO ₃	0,25 M pH 9,0.

Die Lösung wurde über Nacht bei 4°C gegen den Reaktionspuffer dialysiert. Für die Markierung wurden 0,05 mg

Fluoresceinisothiocyanat pro Milligram Protein zugefügt und die Mischung über Nacht bei 40°C im Dunkeln gerührt. FITC-markierte Antikörper wurden vom überschüssigen Fluoresceinisothiocyanat durch Gelfiltration getrennt. Säulenmaterial: Sephadex G 25 in PBS-Azid (PBS + 0,1 % Azid) Säulenvolumen : 1 ml pro mg Fluoresceinisothiocyanat.

11.4.1 Titer- und Spezifitätsbestimmung

Auf ein SDS-Polyacrylamid-Gradientengel wurden im Wechsel Antigen-Proben und Kontrollen aufgetragen. Das fertige Gel wurde auf Nitrocellulose geblottet und diese anschließend in Streifen zerschnitten. Diese Streifen wurden mit Antikörper unterschiedlicher Verdünnung getestet.

12. DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA wurde sowohl die Didesoxymethode (Sanger 1977) mit den Modifikationen von Biggins et al. (1983) als auch die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (Maxam & Gilbert, 1977) eingesetzt. Beide Methoden wurden ansonsten unmodifiziert aus dem Amersham-Protokoll bzw. aus Methods in Enzymology, Vol. 65, übernommen.

13. Computer-Analysen

Samtliche Sequenzvergleiche und Sequenzanalysen wurden auf einem Vax 782-Computer am Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt. Es wurden die Dayhoff-Programme "Relate" und "Naq" sowie die UWGCG-Programme "Stem-Loop" und "Word-Search" verwendet.

IV. ERGEBNISSE

1. Isolierung des Bacterioopsin-Genes

Für die Isolierung des Bacterioopsin-Genes wurde eine Genbank halobakterieller DNA im *E. coli*-Vektor pBR322 konstruiert. 5000 *E. coli*-Kolonien mit rekombinanten Plasmiden, deren mittlere Insertgröße 6 kb betrug, wurden anschließend mit einem radioaktiv markierten Oligodesoxyribonucleotid hybridisiert, dessen Sequenz komplementär zu Sequenzen aus dem Bacterioopsin-Gen ist.

1.1 Aufbau einer Genbank von halobakterieller DNA in pBR322

1.1.1 Vorbereitung des Vektors

15 µg pBR322 wurden mit 30 U *Bam* H I in einem Volumen von 100 µl geschnitten und anschließend mit 100 µg bakterieller alkalischer Phosphatase im gleichen Volumen dephosphoryliert. Die Phosphatase wurde durch Zufügen von EGTA inaktiviert und durch 5 Phenolextraktionen entfernt.

1.1.2 Vorbereitung der halobakteriellen DNA

Mit dem Enzym *Mbo* I wurde eine Abbaukinetik aufgenommen; für einen präparativen Ansatz wurden 320 µg Halobakterien-DNA mit 90 U *Mbo* I 60 min bei 37°C verdaut. Die Fragmente wurden über einen Sucrosegradienten nach Größe getrennt und nach der Fraktionierung zu 4 Größenpools vereinigt.

1.1.3 Ligation und Transformation

10 µg dephosphorylierter pBR322 und 50 µg partiell verdaute Halobakterien-DNA mit einer mittleren Größe von 5 - 10 kb wurden gemeinsam gefällt und in 200 µl Ligasepuffer mit 12 U T4-DNA-Ligase 14 h bei 5°C inkubiert. Aliquots von 0,5 bis 1 µg des Reaktionsgemisches wurden für mehrere aufeinanderfolgende Transformationen in *E. coli* 5K eingesetzt. Ampicillinresistente Transformanten wurden auf Tetracyclinplatten gestempelt und 5000 Clone, die Apr^r und Tc^s waren, für die Koloniehybridisierung in ein vorgegebenes Raster auf frische LB-amp-Platten geimpft.

1.2 Hybridisierung

Für die Hybridisierung der Genbank mit einer Bacterioopsin-spezifischen Probe wurde ein Bereich aus dem Gegenstrang der N-terminalen Sequenz des Bacterioopsins ausgewählt. Durch gezielte Verlängerung eines synthetischen Oligodesoxynucleotids mit Terminaler Desoxynucleotidyltransferase (s. Fig. 1) wurde einerseits das Oligonucleotid radioaktiv markiert, andererseits wurde durch die Elongation mit (dC)₅₋₈ die Anzahl komplementärer Basen auf 19 b erhöht.

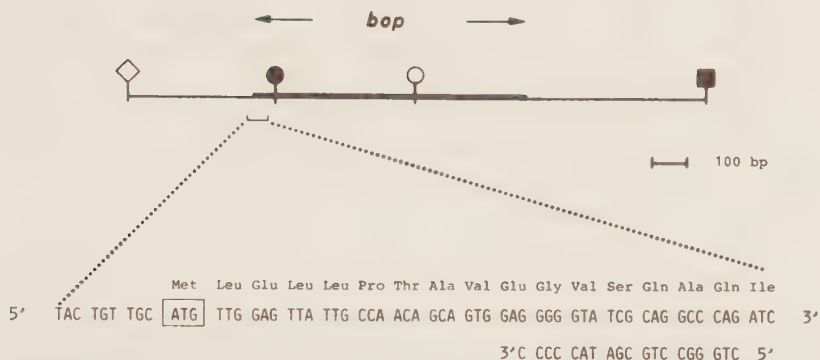


Fig. 1: Graphische Darstellung des 1,6 kb - Fragmentes aus *H. halobium* mit dem Bacterioopsin-Gen. Die vergrößerte Darstellung zeigt Sequenzen im Bereich des 5'Endes der codierenden Sequenzen. Die im Gegenstrang gezeigten Nucleotide entsprechen dem zur Koloniehybridisierung verwendeten Oligodesoxyribonucleotid. Die Symbole für Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme sind auf Seite 139 angegeben.

Die Koloniehybridisierung wurde nach Davis et al. (1980) durchgeführt. Alle 5000 Ap^r, Tc^s Kolonien wurden wie in III.9.1.2 beschrieben zur Koloniehybridisierung vorbereitet. Je drei Filter wurden mit ca. 10⁶ cpm des am 3'-Ende um 5 bis 8 dC - Reste verlängerten 14mers 5'CTGGCCTGCGATA 3' in ca. 10 ml 2xSSPE, 0,2 % SDS, 100 µg/ml Kalbsthymus-DNA, 100 µg/ml Polyribocytidylsaure in eine Tasche eingeschweißt und 40 bis 48 h bei 45°C inkubiert. Waschen erfolgte bei

Raumtemperatur für 3x15 min in 2xSSPE/0,2 % SDS. Die bei Raumtemperatur getrockneten Filter wurden bei -70°C exponiert. Kolonien, die bei der Hybridisierung ein positives Signal ergeben hatten, wurden noch zweimal frisch ausgestrichen und erneut zur Koloniehybridisierung vorbereitet. Die Hybridisierungen ergaben ein reproduzierbar positives Signal bei insgesamt 12 Clonen mit Insertlängen zwischen 2 und 10 kb.

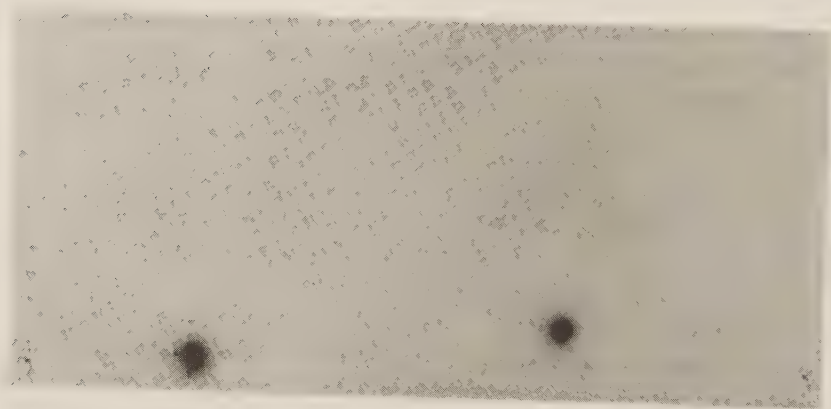


Fig 2: Autoradiographie einer Koloniehybridisierung von Kolonien der Genbank halobakterieller DNA in pBR322 mit dem [^{32}P]-markierten 19mer (s. Abb. 1).

1.3 Charakterisierung

1.3.1 Restrictionsanalyse

Aus der Publikation von Dunn et al. (1981) war bekannt, daß das Bacterioopsin-Gen auf einem 1,6 kb *Bam* HI-*Bst* E II Fragment liegt. Die Inserts aller mit der radioaktiven Probe reagierenden Clone wurden nach *Bam* H I-*Bst* E II-Doppelverdau mit dem markierten Oligodesoxynucleotid in Southernblots hybridisiert und auf die Existenz dieses 1,6 kb - Fragmentes überprüft. Sieben der 12 Clone zeigten das erwartete Fragment, die restlichen 5 hatten entweder die *Bam* H I-Stelle im genaufwärts liegenden Teil oder die *Bst* E II-Stelle im 3'-Bereich des Genes verloren.

Tabelle 1:

Clon	Plasmidgröße (Insert+pBR322)	1,6 kb-Fragment
15-34	6,3 kb	+
18-34	6,9 "	+
27-56	14,1 "	+
30-63	8,1 " "	-
31-15	10,2 "	-
32-05	10,4 "	+
38-58	8,7 "	-
39-63	6,8 "	+
48-17	18,1 "	+
48-25	6,5 "	-
56-44	12,0 "	+
58-78	7,4 "	-

1.3.2 Sequenzierung

Das Bacterioopsin-Gen und das genabwärts liegende 770 bp *Bst* E II Fragment aus pHV18-34 wurden von H. Priess teilweise sequenziert. Dabei ergaben sich für die codierenden Regionen keinerlei Unterschiede zu der von Dunn et al. publizierten Sequenz; lediglich an den Positionen -297, -333, -335 und -340 bezogen auf das Startcodon des Bacterioopsins wurden Transitionen festgestellt, die wahrscheinlich auf stammspezifischen Variationen beruhen.

1.4 Bal 31-Deletionsmutanten von pHV18-34

Das Plasmid pHV18-34 enthält eines der kleinsten mit der radioaktiven Probe reagierenden Inserts; leider aber liegt im 3' Bereich des Genes keine brauchbare Restriktionsstelle für spätere Umclonierungsschritte. Für die Durchführung der Vektor-Konstruktionen für Expression in *E. coli* und *Staphylococcus carnosus* wurden 2 Deletionsmutanten mit neuen Restriktionsstellen im 3' Bereich des Genes hergestellt.

1.4.1 pHV18-34 Δ E3

Das Plasmid pHV18-34 wurde mit *Sal* I linearisiert und durch die doppelstrangspezifische Exonuclease Bal 31 partiell abgebaut. Nachdem zunächst in einem Vorversuch der Zeitpunkt festgestellt worden war, zu dem das 770 bp *Bst* E II Fragment weitgehend abgebaut worden war, während gleichzeitig der *E. coli* Replikations-Origin noch funktionsfähig sein sollte, wurde ein präparativer Bal 31 Abbau durchgeführt (Fig. 4).

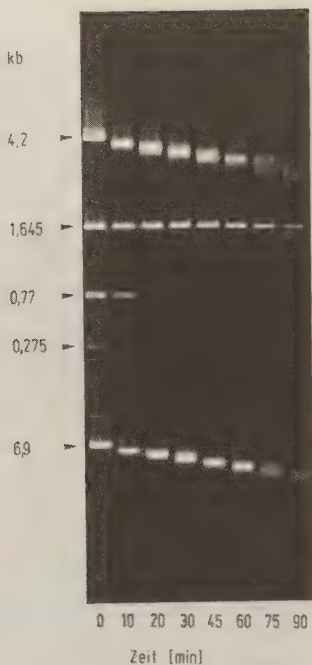


Fig. 4: Preparativer Abbau von *Sal* I-linearisierter pHV18-34 DNA mit Exonuclease Bal 31. Die DNA im unteren Teil wurde direkt aufgetragen, während mit dem im oberen Gel aufgetrennten Material nach dem Bal 31-Abbau ein Doppelverdau mit *Bam* H I und *Bst* E II durchgeführt worden ist. Das ca. 275 bp *Bst* E II-*Sal* I Fragment ist nur bei t=0 sichtbar, das 770 bp *Bst* E II-*Bst* E II ist nach ca. 30 min abgebaut.

Die DNA wurde anschließend mit phosphoryliertem *Hind* III-Linker ligiert und nach der Ligation mit *Hind* III nachgespalten. Bei dieser Spaltung entstehen aus dem linearisierten, Bal 31 behandelten pHV18-34 durch Spaltung an der *Hind* III - Stelle im pBR - Anteil 2 Fragmente mit ca. 3,5 kb und ca. 2 kb. Der gesamte *Hind* III gespaltene Ligationsansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und die beiden erwarteten Fragmente elektroeluiert. Die in diesem Schritt auch von überflüssigem Linker befreiten Fragmente wurden miteinander ligiert und zur Transformation eingesetzt. Von Transformanten mit zwei *Hind* III Schnittstellen im Abstand von ca. 2 kb wurde durch Restrictionsanalysen die richtige Orientierung des pBR-Anteils relativ zu dem größtenteils halobakteriellen Fragment überprüft.

Die Umgebung der neugeschaffenen *Hind* III-Stelle und somit die Größe der Deletion wurde durch Sequenzierung nach Maxam

und Gilbert genauer bestimmt. Die Deletion reicht im pBR-Anteil bis zum Basenpaar an der Position 1462 ± 5 bp (bezogen auf die pBR322-Restriktionskarte), im Bereich halobakterieller DNA bis zur Position 1430 ± 5 bp, bezogen auf das Startcodon des Bacterioopsin-Genes. Daraus folgt, daß insgesamt ca. 1850 bp deletiert worden sind.

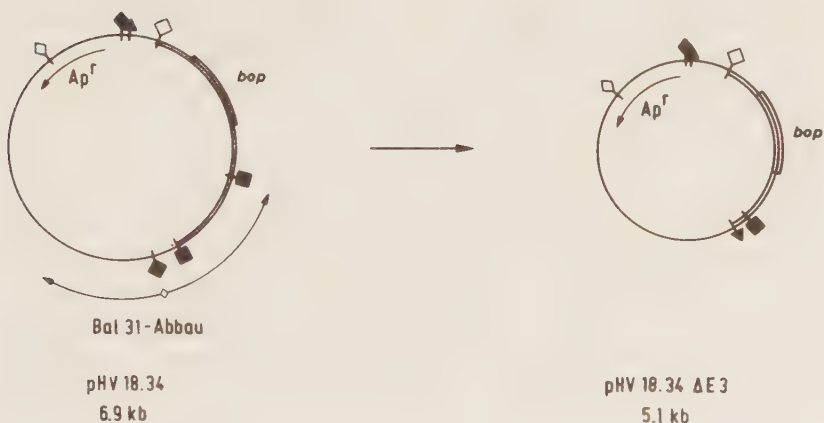


Fig. 5: Karte der Plasmide pHV18-34 und pHV18-34ΔE3. pHV18-34 wurde mit *Sal* I linearisiert, exonucleolytisch abgebaut und mit *Hind* III-Linkern ligiert. Nach Spaltung mit *Hind* III, Ligation der entstehenden Fragmente und Transformation wurde pHV18-34ΔE3 isoliert.

1.4.2 pHV 18-34ΔB13

Aus pHV 18-34 wurde durch Verdau mit *Bst* E II das 770 bp Fragment herausgeschnitten und über einen Sucrosegradienten entfernt. Die verbliebene linearisierte DNA (6,1 kb) wurde so weit als möglich mit *Bal* 31 abgebaut, ohne die pBR-stämmige *Sal* I-Stelle auf der einen Seite und die 80 bp noch dem Translationsstop des Bacterioopsins liegende *Rsa* I-Stelle auf der anderen Seite zu deletieren. Die nucleasebehandelte DNA wurde ligiert und zur Transformation eingesetzt. Die Transformanten wurden auf die oben erwähnten Restriktionsstellen überprüft und der Clon pHV 18-34ΔB13 für die weiteren Arbeiten ausgewählt.

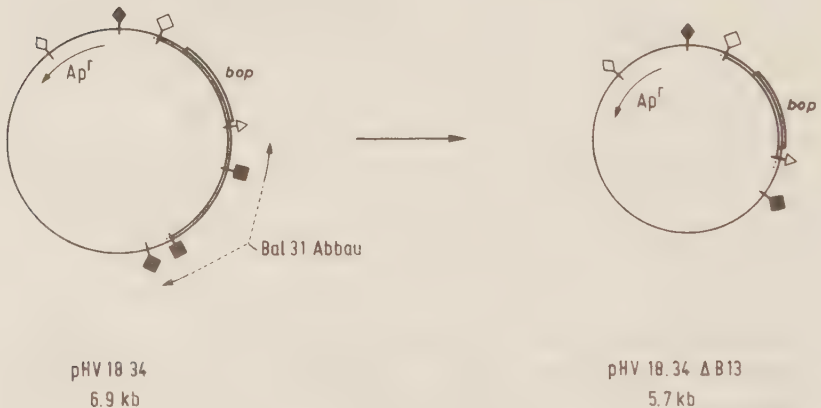


Fig. 6: Abbau von pHV18-34 zu pHV18-34ΔB13. pHV18-34 wurde nach Spaltung mit *Bst* E II mit *Bal* 31 behandelt. Nach Ligation und Transformation wurde pHV18-34ΔB13 isoliert; in diesem Plasmid sind sowohl die *Sal* I-Stelle als auch die *Rsa* I-Schnittstelle aus pHV18-34 noch erhalten.

1.5 Lokalisierung des Bacterioopsin-Genes

Aus den Arbeiten von Weidinger et al. (1979) bzw. Pfeifer et al. (1981) geht hervor, daß Veränderungen des Bacterioopsin-Phänotyps immer korrelierbar sind mit Veränderung in der Struktur von pHH1, des ca. 150 kb großen Plasmides aus *Halobacterium halobium*. Da das Restrictionsmuster von pHH1 für *Pst* I ein ca. 5,3 kb großes Fragment aufweist, lag die Vermutung nahe, dieses Fragment könne mit dem von Dunn et al. beschriebenen *Pst* I-Fragment identisch sein. Aus diesem Grund wurden pHH1, pHH1-freie chromosomale DNA und Halobakterien-Gesamt-DNA isoliert und nach *Pst* I-Verdau elektrophoretisiert und auf Nitrocellulose gebロットet. Der Blot wurde mit nicktranslatiertem pHV18-34 inkubiert und anschließend autoradiographiert. Die Autoradiographie ergab eindeutig keine Hybridisierung der Bacterioopsin-Gen-Probe mit dem Fragmentmuster des pHH1, aber eine gleich intensive Hybridisierung mit plasmidfreier chromosomaler DNA und Gesamt-DNA. Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten von Betlach et al. (1983) überein.

1.6 Charakterisierung von Mutanten

Das Bacterioopsin-Gen liegt nach *Bam* H I-*Bst* E II-Doppelverdau auf einem 1,6 kb Fragment bzw. nach Verdau mit der Restrictionendonuclease *Pst* I auf einem 5,1 kb Fragment chromosomaler DNA. Zur Charakterisierung von Bop⁻ Mutanten wurde Gesamt-DNA aus verschiedenen Stämmen isoliert und mittels Southernblot-Hybridisierung auf Veränderungen in der Größe der bekannten Fragmente getestet. Gleichzeitig hofften wir, auch bei der Untersuchung von Hop⁻ Mutanten auf Veränderungen des 5,1 kb *Pst* I-Fragmentes zu stoßen, die ein Indiz für die Lage des Haloopsins in Nachbarschaft zum Bacterioopsin-Genes gewesen wären.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt:

Stamm	Phänotyp		Insertion in folgenden Fragment:	
	Bop	Hop	5,1 <i>Pst</i> I	1,6 <i>Bam</i> H I- <i>Bst</i> E II
NRL	+	+	-	-
R ₁ M ₁	+	+	-	-
S 9	+	+	-	-
L 07	-	+	+	+
L 33	-	+	+	+
M 18	+	-	+	-
M 20	-	+	+	+
M 24	-	-	(-)	(-)
M 43RW	-	-	+	+
M 43RR	-	+	++	++
M114	-	+	+	+
M180	-	-	+	+
M187	-	-	+	+
M188	-	+	+	n.b.
M191	-	-	+	+
Flx3	-	-	+	+

Im rechten Teil der Tabelle bedeutet

+: Insertion von ca. 520 bp

++: Insertion von ca. 1050 bp

-: keine Insertion, Fragmentgröße wie im Wildtyp

(-): keine Hybridisierung

n.b.: nicht bestimmt.

Wie aus den Daten eindeutig hervorgeht, lassen sich Bop-Mutanten immer mit Insertionen im 5,1 kb *Pst* I-Fragment korrelieren, mit Ausnahme des Stammes M 24, dessen Kopie des Genes offenbar vollkommen deletiert ist (Fig. 7).

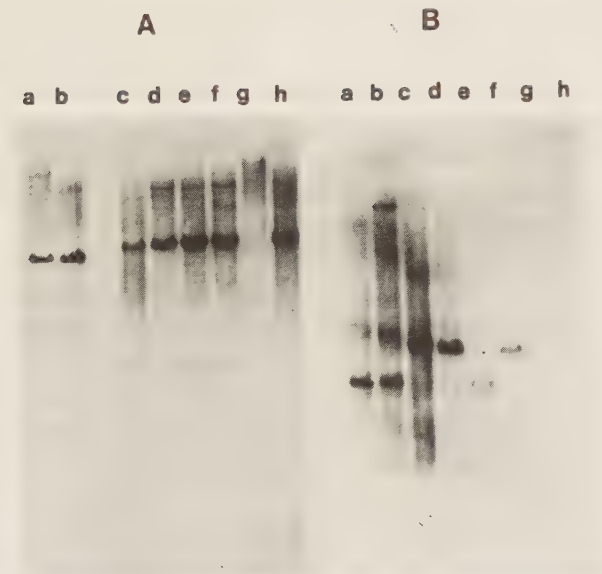


Fig. 7: Southernblot von (A) *Pst* I-gespaltener und (B) *Bam* H I-*Bst* E II-gespaltener chromosomaler DNA. Als Hybridisierungsprobe wurde [32 P]-markiertes Oligonucleotid (s. Fig. 1) verwendet. Die einzelnen Spuren enthalten DNA aus den Halobakterienstämmen a) NRL, b) R1M1, c) L 07, d) L 33, e) M18, f) M20, g) M24, h) M114.

Insertionen im 1,6 kb-Fragment sind jedoch nicht zwangsläufig erforderlich, um die Expression des Bacterioopsin-Genes abzuschalten. Betlach et al. (1983), Pfeifer et al. (1983 und 1984), Simsek et al. (1982) und DasSarma et al. (1983) haben in mehreren Publikationen Insertionsstellen und Sequenzen verschiedener Insertionen näher charakterisiert und dabei festgestellt, daß Insertionen nicht nur im *bop*-Leseraster, sondern auch bis 1400 bp genaufwärts die Expression von Bacterioopsin unterbinden.

Gleichzeitig wird deutlich, das sich die Expression des

Haloopsins nicht unbedingt mit Insertionen in einem der beiden überlappenden bacterioopsin-spezifischen Restrictionsfragmente chromosomaler DNA korrelieren läßt. Eine eindeutige Aussage über die Lokalisierung des Haloopsin-Genes kann auf Grund dieser Daten nicht gemacht werden.

1.7 Expression des Bacterioopsin-Genes

1.7.1 Homologe plasmidcodierte Expression des Bacterioopsin-Genes

Für *Halobacterium halobium* ist bisher kein Transformati-
ons-system bekannt. Für Transformationsversuche an Halobakterien
wurde ein Vektor konstruiert, der folgende Strukturen
enthalten soll:

1. *E. coli*-Replikationsorigin aus pBR322
2. Selektionsmarker für Amplifikation in *E. coli* (β -Lactama-
se) aus pBR322
3. *Halobacterium*-Replikationsorigin aus dem GRB-Plasmid
4. Selektionsmarker für Transformation von Halobakterien,
d.h., *bop* - Gen und *brp* - Gen in der ursprünglichen An-
ordnung aus pHV18-34 Δ E3 und pHV30-63.

Die Schritte der Konstruktion im einzelnen:

(a) Konstruktion von pFE 1

pHV18-34 Δ E3 wurde mit der Restrictionsendonuclease *Aat*
II gespalten; *Aat* II schneidet erstens im pBR322 Anteil
bei Position 4285, zweitens im Bacterioopsin-Gen bei
Position 60 bezogen auf das ATG. Es entstehen ein
Fragment von ca. 880 bp und ein 4,2 kb Fragment, auf
dem das β -Lactamase-Gen, der *E. coli*-Origin und das
Bacterioopsin-Gen ab Pos. 60 liegen. Das 4,2 kb
Fragment wurde isoliert und mit dem 2,7 kb *Aat* II
Fragment aus pHV30-63 ligiert. Dieses 2,7 kb Fragment
enthält die ersten Basenpaare des Bacterioopsin-Genes,
den Bereich zwischen *bop* - und *brp* - Gen, das *brp* - Gen
und ca. 1000 bp aus dem downstream-Bereich des *brp* -
Genes (s. Fig. 3). Nach der Transformation in *E. coli*
HB 101 wurden mehrere Clone auf die Existenz des bei
richtiger Orientierung zu erwartenden 1560 bp

Asp 718-*Sal* I Fragments bzw. 456 bp *Xho* II Fragments getestet. Einer der Clone, pFE 1, dessen Restrictionsmuster beide Fragmente aufwiesen, wurde nach *Asp* 718 - Spaltung und Dephosphorylierung am 5' Ende radioaktiv markiert und einer DNA-Sequenzbestimmung nach Maxam und Gilbert unterworfen. Die Sequenzierung bestätigte die vorgesehene und fehlerfreie Fusion an der im Bacteriopsin-Gen liegenden *Aat* II Stelle.

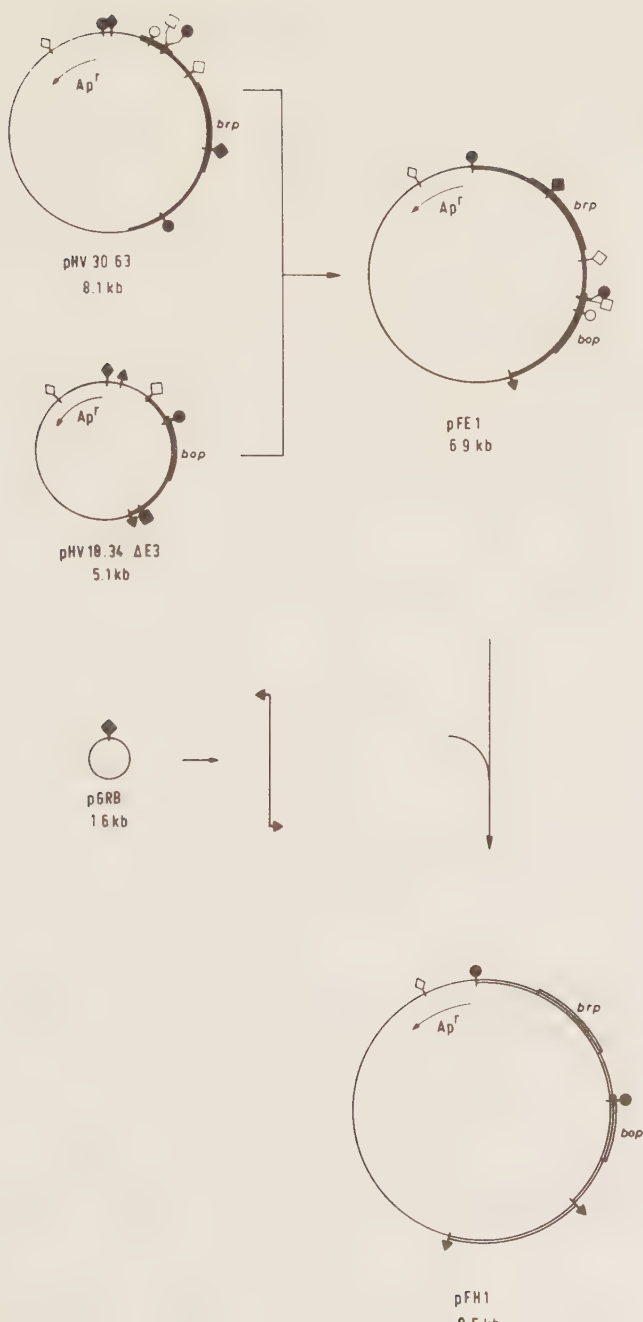
- (b) Ersatz der *Sal* I-Schnittstelle im GRB-Plasmid durch eine *Hin* d III-Schnittstelle

Das 1,6 kb-Plasmid aus GRB wurde mit *Sal* I gespalten, die überstehenden Enden mit *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenowfragment) aufgefüllt und mit phosphorylierten *Hin* d III-Linkern ligiert. Nach der Ligation wurde mit *Hin* d III nachgespalten und das Plasmid von überschüssigem Linker abgetrennt.

- (c) Konstruktion von pFH 1

Die unter (a) beschriebenen Manipulationen hatten den pBR-Anteil zwischen der *Aat* II-Stelle und der *Bam* H I-Stelle deletiert, also die *Hin* d III-Schnittstelle im pBR322-Teil entfernt. Einzige *Hin* d III-Schnittstelle im verbliebenen Teil des Vektors ist die in pHV18-34AE3 eingeführte *Hin* d III-Stelle (s. oben), die in pFE 1 erhalten ist. pFE 1 wurde mit *Hin* d III linearisiert, anschließend dephosphoryliert und mit dem ebenfalls *Hin* d III-gespaltenen GRB-Plasmid aus (b) ligiert; das resultierende Hybrid pFH 1 wurde isoliert.

Fig. 8 (Seite 77): Konstruktion von pFH 1. Beschreibung siehe Text.



1.7.2 Expression des clonierten *bop* - Genes in *E. coli*

(1) Expression ohne *E. coli*-Promotor

Die von pHV18-34, pFE 1 und pFH 1 exprimierten Proteine wurden durch SDS-Lysate der *E. coli*-Clone in Westernblots analysiert. Die in *E. coli* exprimierten Proteine reagierten nicht mit einem sehr spezifischen polyclonalen Antikörper gegen Bacteriorhodopsin, d.h., Expression konnte nicht nachgewiesen werden.

(2) Expression unter Kontrolle des λp_L -Promotors

Für den Versuch der *bop* - Expression unter der Kontrolle eines *E. coli*-Promotors in *E. coli* wurde das Plasmid pPLc24 (Remaut et al., 1981) gewählt, das den λp_L -Promotor enthält sowie die Ribosomenbindungsstelle und die ersten 296 bp der codierenden Sequenz der MS2-Polymerase (s. Text S. 86). Die codierenden Sequenzen der MS2-Polymerase wurden exakt durch das Bacterioopsin-Gen ersetzt, ohne daß der Abstand zwischen Promotor und ATG bzw. ribosomaler Bindungsstelle und AUG verändert wurde. Es war vorgesehen, das Bacterioopsin-Gen auf dem *Hind* III-Fragment aus pHV 18-34ΔE3 in einen einzelsträngigen DNA-Phagen, M13 oder fd 109, umzuclonieren. Die einzelsträngige Form des rekombinanten Phagen sollte mit einem Oligodesoxynucleotid hybridisiert werden, das komplementär zu den ersten 7 Codons des Genes ist. Nach Auffüllen des Einzelstranges bis mindestens zur downstream gelegenen *Hind* III Stelle sollte durch Behandlung mit der einzelstrangspezifischen Nuclease S 1 und Nachspaltung mit *Hind* III ein Fragment erzeugt werden, daß exakt mit dem ATG des Bacterioopsins beginnt und im 3' Bereich des Genes ein *Hind* III überstehendes Ende hat. Die Schwierigkeiten dieses Ansatzes begannen schon mit der Umclonierung in M13mp9: die Transformanten wiesen regelmäßig 2 verschieden große RF-Spezies auf, deren

größere mit jeder Passage zu Gunsten der kleineren abnahm. Die Plasmidanreicherung aus 100 ml Medium (large scale Miniprep) aus dem einzigen Clon, der in Minipreparationen relativ stabil zu sein schien, führte zur Isolierung eines Gemisches deletierter circularer DNA-Specien, dessen Hauptkomponente ein ca. 2 kb großes Plasmid war und das in sehr hoher Kopienzahl vorgelegen haben muß: aus 100 ml Kultur wurden 1,8 mg DNA isoliert.

Alternativ wurde der Einzelstrang durch Abbau mit der Exonuclease III freigelegt. Dabei konnte gezeigt werden, daß beim Abbau *Pvu* II-gespaltenen pHV 18-34ΔE3's mit Exonuclease III zwei verschieden große Einzelstränge entstehen, von denen einer mit Oligonucleotiden, die den ersten 21 bzw. 24 bp des Bacterioopsin-Genes entsprechen, hybridisiert. Der Versuch, diese Oligonucleotide als Primer auf dem freigelegten Einzelstrang zu verwenden, scheiterte in mehreren Versuchen, in denen die Verlängerung des Primers mit T 4 DNA-Polymerase oder mit dem Klenowfragment der DNA-Polymerase I versucht wurde. Veränderung aller gängigen Parameter, wie Salzkonzentration, Primer-DNA-Verhältnis, Hybridisierungsbedingungen, Reaktionstemperatur und Enzymkonzentration führten nicht zu einem signifikant über dem Background liegenden Einbau, obwohl die radioaktiv markierten Oligodesoxynucleotide mit auf Nitrocellulose fixierter einzelsträngiger Bacterioopsin-DNA hybridisierten. Die Begründung liegt wahrscheinlich in der Selbstkomplementarität der ersten Basenpaare des Bacterioopsin-Genes: sowohl beim Primer als auch in der einzelsträngigen DNA ist in Lösung die intramolekulare Ausbildung von Sekundärstrukturen, in diesem Fall einer "stem and loop"-Struktur, gegenüber der intermolekularen Hybridisierung begünstigt. Als Ausweg unter Vermeidung eines "Priming"-Schrittes bei der Konstruktion des

Expressionsvektors bot sich die Clonierung von Oligonucleotiden an. Zu diesem Zweck wurden folgende Vorstufen hergestellt:

1. das 2,8 kb *Eco* R I-*Hin* d III Fragment aus pPLc24; es enthält den *E. coli* Replikations-Origin, das β -Lactamase-Gen und den λ p_L-Promotor.
2. das 136 bp *Eco* R I-*Taq* I Fragment aus pPLc24; auf ihm liegen die Ribosomenbindungsstelle und die ersten 4 bp der MS2-Polymerase. Dafür war pPLc24 zuerst mit *Taq* I gespalten worden, anschließend durch Spaltung mit *Eco* R I das Fragment (b) hergestellt worden:

```
Aus ---GAATTC-----ATGTCGA--
                               ca. 130 bp      (a)
---CTTAAG-----TACAGCT--
```

wird nach Spaltung mit *Taq* I und *Eco* R I

```
AATTC-----ATGT
                                     (b)
G-----TACAGC
```

3. das *Aat* II-*Hin* d III Fragment aus pHV18-34ΔE3; es enthält die Sequenzen des Bacterioopsin-Genes von Position 60 bis über den Transcriptionsstop hinaus.

4. zwei einander komplementäre Oligodesoxynucleotide, die nach der Hybridisierung miteinander einerseits die *Aat* II Stelle des Genes rekonstituieren, andererseits die für die Ligation mit dem *Taq* I Ende notwendigen überstehenden Basen aufweisen.

	Ser	Gln	Ala	Gln	Ile	Thr	Gly	Arg
Nuc Eco I	5'	GC	CAG	GCG	CAG	ATC	ACC	GGA CGT
Nuc Eco II	3'	GTC	CGC	GTC	TAG	TGG	CC	

Ligation des Oligonucleotidhybrids mit (3.) regeneriert die codierenden Sequenzen für das reife Bacterioopsin; Ligation mit dem *Eco* R I - *Taq* I Fragment ergänzt das Methionincodon und ein Serincodon. Die Verbindung mit dem Vektorteil (1.) aus pPLc24 führt zu einem pPLc24 Derivat, das Expression des Bacterioopsins unter der Kontrolle des λ cI-Repressors erlauben sollte.

Das von diesem Konstrukt abgelesene Protein sollte ein Bacterioopsin mit zwei zusätzlichen Aminosäuren (Met, Ser) sein, die im unprozessierten Bacteriorhodopsin an erster und letzter Stelle desjenigen Peptides stehen, das durch das Prozessieren abgespalten wird.

Unprozessiertes Protein:	M L E L L P T A V E G V S	Gln Ala
Reifes Protein		Gln Ala
Erwartetes Translationsprodukt		
von pPLc24-Derivat	Met-----	Ser Gln Ala

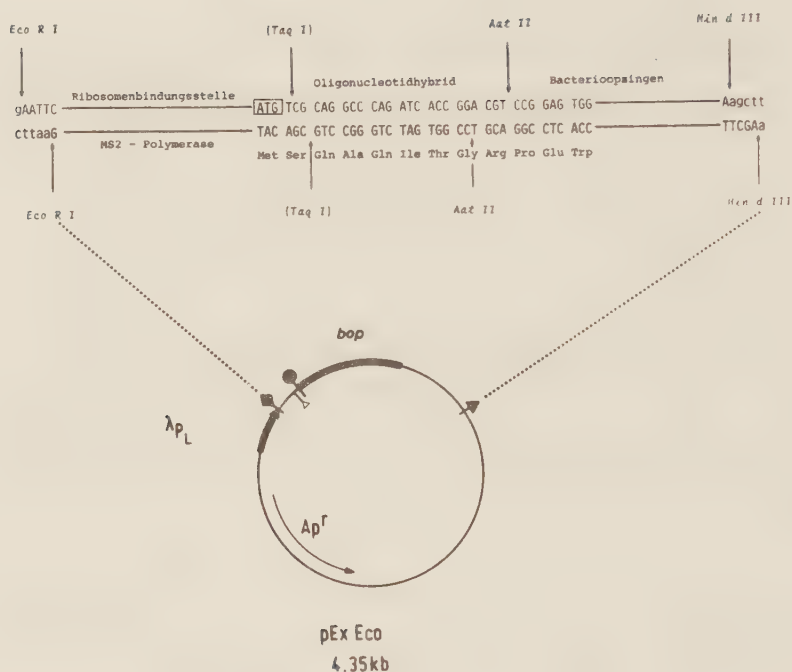
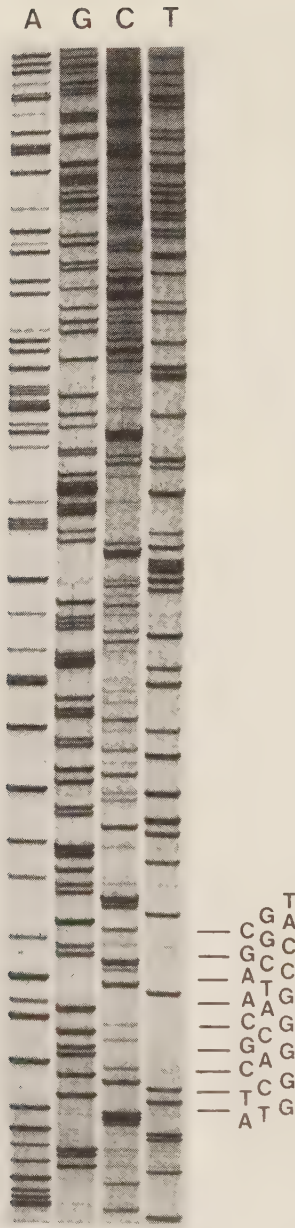


Fig. 9: Konstruktion von pExEco. Genaue Beschreibung siehe Text. Der vergrößerte Teil stellt den Bereich der Fusion von Ribosomenbindungsstelle (MS2), Oligonucleotidhybrid und Bacterioopsin-Gen dar. Die relevanten Restriktionsstellen sind hervorgehoben, ebenso der Translationsbeginn des Proteins. Die kleinen Buchstaben stehen für den Anteil der Restriktionserkennungsstellen, die zu dem unter 1. beschriebenen 2,8 kb *Eco R I*-*Hin d III* Fragment aus pPLc24 gehören. Die ehemalige *Taq I*-Stelle ist in Klammern und verkleinert in das Vektorinnere gezeichnet; sie geht durch die Fusion mit dem Oligonucleotidhybrid verloren.

Für die Konstruktion von pExEco wurden 25 µg pPLc24 mit *Eco* R I und *Hind* III gespalten, mit CIP dephosphoryliert und das 2,8 kb-Fragment (1.) nach Elektrophorese eluiert. Dieses Fragment (Ausbeute 20 µg) wurde ligiert mit 9 µg des 1,37 kb-Fragmentes (3.), das aus 25 µg pHV18-34AE3 nach Spaltung mit *Aat* II und *Hind* III und anschließender elektrophoretischer Reinigung isoliert worden war. Das Ligationsgemisch wurde mit *Aat* II nachgespalten, um Dimerisierung an der nicht dephosphorylierten *Aat* II-Stelle zu verhindern. Das entstandene 4,5 kb-Fragment wurde wiederum aus einem präparativen Agarosegel eluiert (Ausbeute ca. 7 µg) und 3 µg zur Ligation mit 0,5 µg des *Eco* R I-*Aat* II Fragmentes, das aus der Ligation von 1,5 µg des 136 bp-Fragmentes (2.) und 1 nMol des Oligonucleotidhybrides (4.) hervorgegangen war, eingesetzt. Der Dimerisierung bei der Ligation von 2. und 4. war wiederum durch Nachspaltung mit der Restriktionsendonuclease, für die ein phosphoryliertes Ende vorhanden war (*Eco* R I), vorgebeugt worden. Auch dieses Fragment wurde über ein präparatives Agarosegel von nicht ligierten Bestandteilen gereinigt. Nach Transformation des letzten Ligationsgemisches (2./4. + 1./3.) in *E. coli* RR1[pcI857] wurden DNA-Minipräparationen der Transformanten mit den Enzymen *Eco* R I und *Asp* 718 auf die Existenz des erwarteten 350 bp-Fragmentes überprüft.

Die gelelektrophoretische Analyse des Clones ergab das bei angestrebter Fusion der entsprechenden Fragmente erwartete Ergebnis für mehrere doppelte Restrictionsspaltungen. Der korrekte Einbau des Oligodesoxyribonucleotidhybrides wurde durch Sequenzierung des *Eco* R I-*Asp* 718 Fragmentes nach Clonierung in M13mp19 bestätigt.

Fig. 10 (S. 84): Autoradiogramm der Didesoxysequenzierung des *Eco* R I-*Asp* 718 Fragmentes in M13mp19. Der Translationsstart des verkürzten Bacterioopsins und die Sequenzen bis zur *Aat* II-Stelle sind angegeben.



1.7.3 Nachweis der Expression in *E. coli*

Die von pExEco gesteuerte Expression in *E. coli* RR1[pc1857] wurde nach Hitzeinduktion zwischen 20 Minuten und 5 Stunden im Westernblot überprüft. Zum Nachweis wurden polyclonale, sehr spezifische Antikörper gegen Bacterioopsin eingesetzt, deren Bindung durch Reaktion mit FITC-markierten Ziegen-Antikörpern gegen Kaninchen-Immunglobulin G hätte nachgewiesen werden sollen. Es ließ sich jedoch keine Expression nachweisen. Gleichwohl nahm die Lebensfähigkeit der induzierten Zellen nach 2 Stunden Hitzeinduktion im Vergleich zur nicht induzierten Kultur stark ab.

2. Versuch zur Isolierung des Haloopsin-Genes

2.1 Beschreibung des verwendeten Vektors

Für die induzierbare Expression von Fusionsproteinen in *E. coli* wurde der Vektor pPLc24 (Remaut et al., 1981) eingesetzt. pPLc24 besteht aus folgenden Komponenten:

- (a) λ_L -Operator und Promoter-Region
- (b) Ribosomenbindungsstelle der MS2-Replikase (Fiers et al., 1976)
- (c) die N-terminalen 98 Codons der MS2-Replikase mit 2 Clonierungsstellen am Übergang von MS2- zu pBR-Anteilen: *Bam* H I und *Hin* d III
- (d) pBR-Sequenzen zwischen Position 2062 und 4180 mit dem Col E 1 - Replikationsorigin und β -Lactamase-Gen.

2.2 Aufbau der Genbank in pPLc24

Eine Expressionsgenbank des halobakteriellen Genoms wurde durch Insertion von ca. 1000 bp großen, durch partiellen Verdau mit der Restrictionseendonuclease *A*lu I erzeugten chromosomalen Fragmenten in die *Bam* H I Stelle von pPLc24 konstruiert. Dafür wurden die Enden des linearisierten Vektors mit (dC)₁₄ verlängert, während die chromosomalen DNA-Fragmente mit (dG)₂₇-Ketten versehen wurden. Damit sind fast die optimalen Bedingungen für eine hohe Transforma-

tionseffizienz gegeben: nach Daten von Peacock et al. (1981) ist die Transformationsrate bei homopolymerligierten Plasmiden sehr stark von der Länge der homopolymeren Enden abhängig. Die Werte für höchste Effizienz liegen bei (dC)₁₅ und (dG)₂₀. Durch Addition von Cytidinresten an die aufgefüllte *Bam* H I-Schnittstelle wird die *Bam* H I Erkennungssequenz regeneriert; das ermöglicht ein leichtes Ausschneiden des Insertes. Für die Transformation wurde *E. coli* RR1[pcI857] als Rezipient gewählt; für *E. coli* RR1 sind bei Transformation mit homopolymerligierten Plasmiden 10fach höhere Transformationseffizienzen im Vergleich zu dem *rec A*-Stamm HB 101 beschrieben worden (Peacock et al., 1981). Da *E. coli* RR1 selbst keine chromosomale Kopie des λ CI Repressors enthält, wurde das Gen für den temperatursensitiven Repressor cI857 in trans auf dem Plasmid pcI857 (Remaut et al., 1983) zur Verfügung gestellt. pcI857 gehört zu einer anderen Inkompatibilitätsgruppe als der von pBR abgeleitete pPLc24; es liegt in hoher Kopienzahl vor und enthält eine Kanamycin-Resistenz als selektierbaren Marker.

2.2.1 Vorbereitung des Vektors pPLc24

Das Plasmid pPLc24 wurde mit der Restriktionsendonuclease *Bam* H I linearisiert, die dabei entstandenen "sticky ends" mit dem Klenowfragment der Polymerase I aus *E. coli* aufgefüllt und schließlich mit Terminaler Desoxynucleotidyltransferase homopolymere Enden angefügt. Jeder dieser Schritte ist im folgenden detailliert beschrieben.

(1) Linearisierung des Plasmides

55 μ g des Plasmides wurden mit 55 U *Bam* H I in 250 μ l *Bam* H I-Puffer für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde durch Zugabe von 10 μ l 0,5 M EDTA inaktiviert, anschließend durch 2 Phenolextraktionen entfernt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde gelelektrophoretisch überprüft.

(2) Auffüllen der "sticky ends"

In die Klenow-Reaktion wurden 50 μg linearisierter Plasmid-DNA eingesetzt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und der [^3H] dTTP-Einbau durch Messung des säurefällbaren Materials bestimmt (Fig. 11).

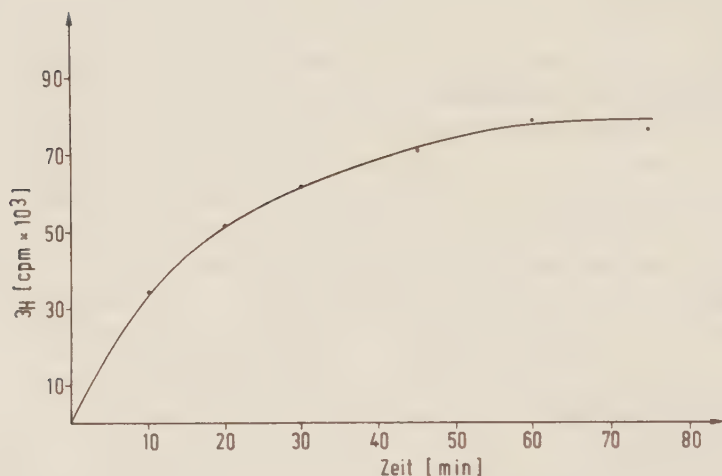


Fig. 11: Verlauf der Einbau-Reaktion von [^3H]dTTP in die durch *Bam* H I erzeugten 5'überstehenden Enden des Vektors pPLc24. Die Reaktion wurde durch Messung der säurefällbaren counts verfolgt.

Nach 75 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μl 0,5 M EDTA beendet und nicht umgesetztes [^3H] dTTP vom Produkt durch Gelfiltration abgetrennt (Fig. 12). Hierzu wurden von jeder Fraktion 2x2 μl abgenommen und die Radioaktivität direkt bzw. nach Säurefällung gemessen.

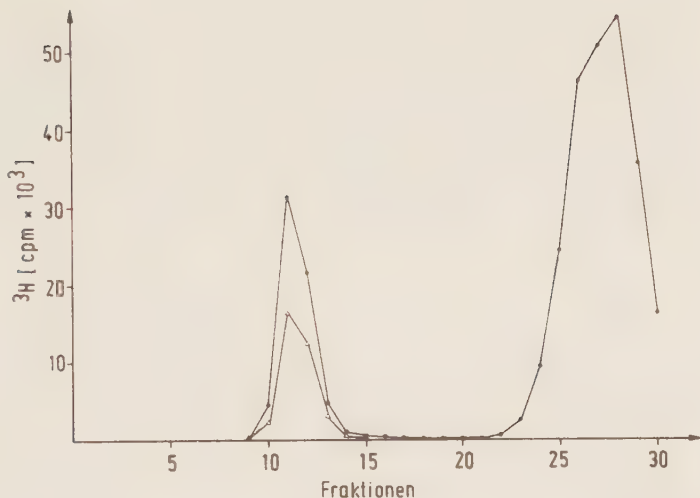


Fig. 12: Chromatographie zur Trennung des Vektors von überschüssigem Triphosphat.

● : cpm bei direkter Messung

Δ : cpm nach Säurefällung

Säulenmaterial: Sephadex G 75 in TE-Puffer;

Fraktionsgröße: 10 Tropfen; Bettvolumen: 10 ml.

Die produkthaltigen Fraktionen (Fraktionen 10-13) wurden vereinigt und auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen. Die nach Ethidiumbromid-Anfärbung unter UV-Licht fluoreszierende Bande wurde ausgeschnitten und elektroeluiert.

(3) Anfügen von homopolymeren Enden

Die optimalen Bedingungen für die Verlängerung des Plasmides um ca. 15 dC-Resten wurden mit 2 μg Plasmid etabliert. Die Reaktion wurde bei 37°C durchgeführt; für die präparative Durchführung wurde die Reaktion nach 40 min durch Zugabe von EDTA abgestoppt.

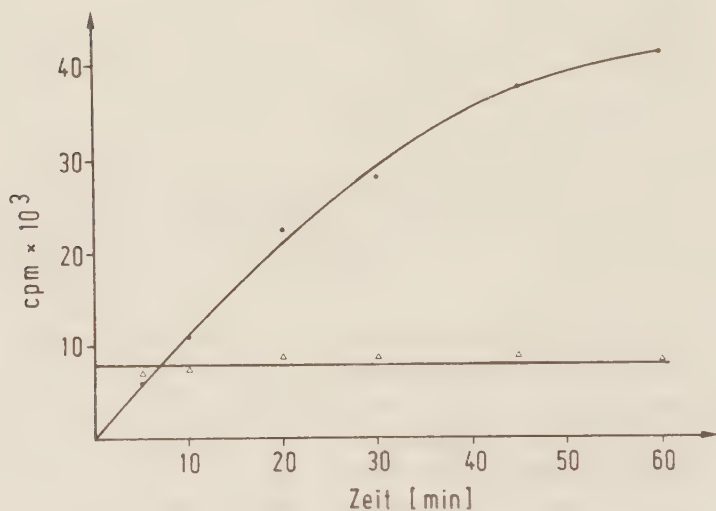


Fig. 13: Verlauf der Reaktion der Terminalen Deoxynucleotidyltransferase mit dem aufgefüllten Plasmid. Die Kurve (●) repräsentiert die [³²P]cpm nach Säurefällung von Aliquots des Reaktionsansatzes, die Gerade (Δ) gibt die Konstanz der [³H]cpm wider.

2.2.2 Vorbereitung der chromosomalen Halobakterien-DNA

Nach III.5.3.1. isolierte Gesamt-DNA aus *Halobacterium halobium* wurde mit der Restrictionsendonuclease *Alu* I partiell gespalten, um bevorzugt ca. 1 kb-Fragmente zu erzeugen. Die partialgespaltene DNA wurde über einen Sucrosegradienten nach Größe aufgetrennt und anschließend mit Homopolymerenden versehen.

(1) *Alu* I-Partialsplaltung

300 µg aus dem Stamm *Halobacterium halobium* L 33 (Bop⁻, Hop⁺, Rub⁻, Vac⁻) isolierte DNA wurden in 750 µl *Alu* I-Puffer mit 75 U Enzym inkubiert. Nach 10 min wurde die erste Hälfte, nach 20 min der Rest des Reaktionsansatzes entnommen und die Nuclease durch Hitze inaktiviert. Die DNA wurde über Sucrosegradienten nach Größe aufgetrennt und fraktioniert. Fraktionen mit Fragmenten von ca. 1200 bzw. 1500 bp wurden vereinigt.

(2) Anfügen von Homopolymer-Enden an chromosomale Fragmente

Die optimalen Bedingungen für die Addition von ca. 20 dG-Resten an die Fragmente chromosomaler DNA waren mit 1 µg der Spaltstücke etabliert worden. Die Reaktion wurde bei 37°C durchgeführt und nach 30 min durch 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

(3) Homopolymerligation

Je 10 nMol des Plasmides und der chromosomalen Fragmente wurden durch zweistündige Inkubation bei 58°C durch Hybridisierung der homopolymeren Enden nicht-enzymatisch ligiert.

2.2.3 Transformation mit homopolymerligierten Plasmiden

Für die Transformation wurde der Stamm *E. coli* RR1 verwendet. Dieser Stamm hat keine chromosomale Kopie des λ -Repressors, die deshalb extrachromosomal zur Verfügung gestellt werden muß. Vor der Transformation mit homopolymerligierten Plasmiden wurde das high copy number Plasmid pcI857 (Remaut et al., 1983), das das Gen für den temperatursensitiven cI-Repressor trägt (s.o.), in *E. coli* RR1 eingeführt.

Die mit pcI857 und homopolymerligierten Plasmiden transformierten Zellen wurden auf Km- und Ap- haltigen Platten selektioniert.

Nach Transformation homopolymerligierter Plasmide in *E. coli* RR1[pcI857] wurden ca. 80 000 ap^rkm^r Clone isoliert, die zum Test mit Antikörpern auf ca. 150 Nitrocellulosefilter (Durchmesser 82 mm) übertragen wurden.

2.3 Immunotest der Transformanten

2.3.1 Produktion von Antikörpern

Gegen Halorhodopsin wurden 2 verschiedene Antikörper gewonnen:

- (1) durch Immunisierung mit denaturiert angereichertem Halorhodopsin ohne weitere Nachreinigung
- (2) durch Immunisierung mit zwar nativ angereichertem, aber anschließend durch präparative Gelelektrophorese nachgereinigtem Haloopsin.

Die Immunisierung von Kaninchen erfolgte nach dem

beschriebenem Standardverfahren (s. III.11.1) unter Verwendung von Freund'schem Adjuvans.

2.3.2 Test der Antikörper

Beide Antikörper wurden auf Spezifität und Titer getestet. Dafür wurden verschiedene Verdünnungen des Antikörpers mit Westernblotstreifen inkubiert, auf denen jeweils die aus einem SDS-PAG übertragenen 3 Spuren

1. Haloopsin,

2. Bacterioopsin und

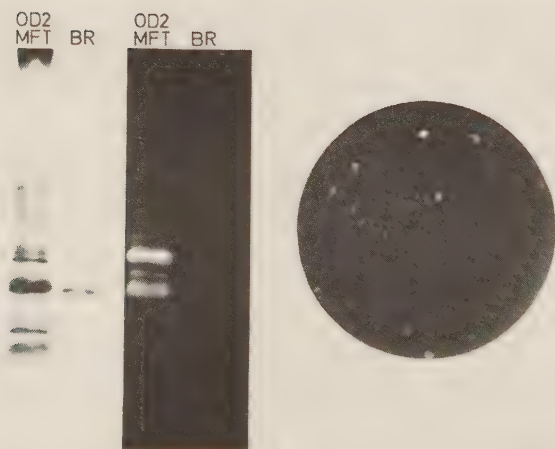
3. Gesamtmembranfraktion von *H. halobium* Stamm OD2

aufgetragen waren. Die gebundenen Antikörper wurden anschließend durch Reaktion mit FITC-markiertem Ziege-anti-Hase IgG angefärbt.

- (1) Das Serum mit dem gegen denaturiert angereichertes Haloopsin gebildeten Antikörper reagierte bei einer Verdünnung von 1:500 nur mit Haloopsin und einem Protein bei 36 kD. Dieses Protein halten wir auf Grund der Beobachtung, daß es auch in Präparationen elektrophoretisch gereinigten Haloopsins auftritt, für ein Haloopsin-Dimeres, das durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen zweier Monomere entsteht. Schon bei einer Verdünnung von 1:250 aber wurden mehrere andere Membranproteine angefärbt (s. Fig. 14). Eine Kreuzreaktion mit Bacterioopsin fand dagegen auch bei Einsatz einer 1:50 Verdünnung nicht statt.

Die IgG-Fraktion dieses Antiserums wurde über Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose angereichert und mit Fluoresceinisothiocyanat markiert. Dabei wurde das Gesamtvolumen auf 2/3 reduziert. Im Test ergab die Verdünnung von 1:500 wieder 2 schwach, aber deutlich sichtbare Banden für Haloopsin und die 36 kD-Bande. Die Immunotests wurden mit einer Verdünnung von 1:300 durchgeführt.

Fig. 14: Westernblot und Immunotest des FITC-markierten Antikörpers gegen denaturiert angereichertes Halorhodopsin. Die linke Bildhälfte zeigt ein SDS-Gel und den entsprechenden Westernblot nach Anfärbung mit dem Antikörper. Die Bacterioopsin-Kontrolle ist offensichtlich negativ, während in der Membranfraktion von OD2 mehrere Proteine mit dem Antikörper reagieren. Der mit dem gleichen Antikörper angefärbte Nitrocellulosefilter auf der rechten Bildhälfte zeigt Bindung des Antikörpers an mindestens 15 von 550 unabhängigen Transformanten.



- (2) Das gegen elektrophoretisch nachgereinigtes Halorhodopsin gebildete Serum reagierte im Test bei einer Verdünnung von 1:50 bis 1:10 spezifisch mit der Haloopsin-Bande. Im Dot-Blot mit auf Nitrocellulose aufgetragenem Protein konnten mit 1:10 verdünntem Serum noch 10 ng denaturiertes Haloopsin nachgewiesen werden. Auch aus diesem Serum wurde die IgG-Fraktion angereichert und FITC-markiert; das Volumen der markierten IgG-Fraktion wurde dabei wieder auf $\frac{2}{3}$ reduziert, für die Tests aber der Verdünnungsfaktor 10 beibehalten.

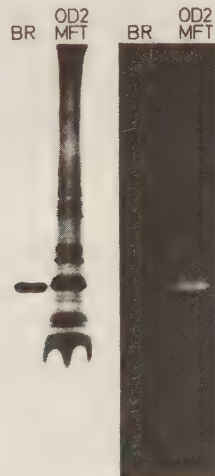


Fig. 15: Westernblot von Bacterioopsin und Gesamtmembranfraktion (OD2) nach Reaktion mit dem gegen elektrophoretisch gereinigtes Haloopsin gewonnenen Antikörper. Dieser Antikörper reagiert mit nur einem Protein der Gesamtmembranfraktion, nämlich Haloopsin.

Weitere Westernblot-Analysen zeigten, daß der Antikörper zwar spezifisch mit nur einem Protein der Membranfraktion, nämlich Haloopsin, reagierte, daß aber außerdem noch 4 halobakterielle cytoplasmatische Proteine (MW: 94 kD, 61 kD, 52 kD, 35 kD) mit den Antikörpern dieser IgG-Fraktion reagierten. Im Immunotest störte zusätzlich die starke Reaktion mit *E. coli*-Proteinen. Sie konnte jedoch durch Vorbehandlung des Filters mit einem Nullserum stark reduziert werden.

2.3.3 Ergebnis der Immunotests

80 000 Transformanten wurden zuerst mit dem relativ wenig spezifischen Antikörper (1) untersucht, davon reagierten rund 800 Clone positiv. Für diese Clone wurde anschließend ein Immunotest mit dem spezifischen Antikörper (2) durchgeführt; die Anzahl positiver Clone konnte so auf 5 reduziert werden.

2.3.4 Kontrolle positiver Clone

Aus allen 5 Clonen wurde Plasmid-DNA isoliert und zur Transformation erstens in den ursprünglichen Stamm *E. coli* RR1[pcI857] und zweitens in *E. coli* W 6 eingesetzt. Der Stamm W 6 enthält eine chromosomale, nicht temperatursensitive Kopie des λ cI-Repressors.

(1) Induzierbarkeit der Fluoreszenz

Für die Transformanten in beiden Stämmen wurde die Induzierbarkeit der Expression getestet, indem je 2 Platten parallel über Nacht bei 30°C angezogen wurden, deren eine dann für 5 Stunden bei 43°C inkubiert wurde. Der Vergleich induzierter und nicht induzierter Kolonien zeitigte das erwartete Ergebnis:

- (a) Die mit den Plasmiden pJS5-8, pJS6-5, pJS7-13, pJS7-18 und pJS7-31 transformierten Zellen des Stammes *E. coli* RR1[pcI857] fluoreszierten ohne Induktion genau so wenig wie der Rezipientenstamm selbst. Nach Induktion wurde bei allen 5 Clonen reproduzierbar ein stark mit dem Serum reagierendes Protein angefarbt, während der Rezipient nur schwache Fluoreszenz erkennen ließ.

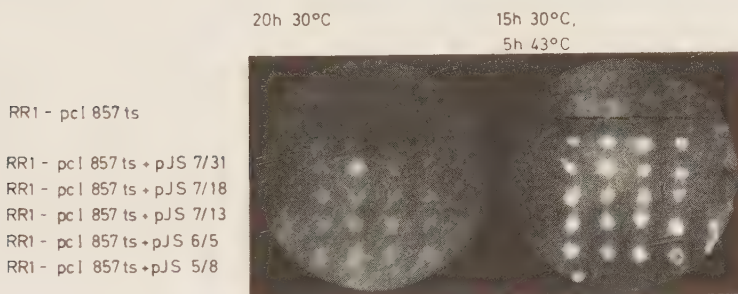


Fig. 16: Induktion der Expression. 2 Platten mit je 4 Kolonien der 5 durch Immunoscreening isolierten Clone sowie der Rezipientenstamm wurden über Nacht bei 30°C inkubiert und anschließend auf Nitrocellulosefilter übertragen. Die Filter wurden parallel 5 h bei 30°C (linke Bildhälfte) bzw. bei 43°C inkubiert und anschließend wie beschrieben getestet.

- (b) Die mit den 5 Plasmiden transformierten Zellen des Stammes *E. coli* W6 fluoreszierten leicht, unabhängig davon, ob die Kolonien vor dem Immuntest bei 43°C inkubiert worden waren. Die leichte Fluoreszenz im nicht induzierten Zustand spricht für eine geringe

Expression: offensichtlich ist für den Fall, daß exprimierte Gene auf high copy number Plasmiden liegen, die Repressormenge im Stamm W 6 nicht ausreichend.

(2) Korrelierbarkeit von Expression und Plasmidpräsenz

Die induzierbar exprimierten antigenen Determinanten sind eindeutig plasmidcodiert, da sich die Fähigkeit zur Expression durch Transformation übertragen läßt.

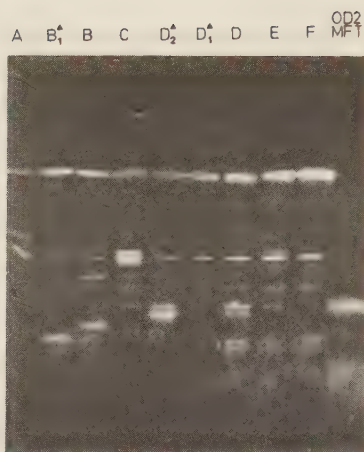
2.4 Charakterisierung der induzierbar exprimierten Proteine

2.4.1 Extraktion der Proteine nach Induktion

Für die Extraktion von Protein aus induzierten Kulturen, den Nachweis induzierbar exprimierten Proteins im Westernblot und die Isolierung des exprimierten Fusionsproteins aus präparativen Plattengelen wurden 3 bis 5 Km-Ap-Platten des entsprechenden JS - Clones mit jeweils ca. 5000 Kolonien plattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 30°C inkubiert und die Expression durch 5 Stunden Inkubation bei 43°C induziert. Die Kolonien wurden mit einem breiten Spatel von der Platte abgeschabt, in 300 µl TE-Puffer + 0,2 mM PMSF resuspendiert und durch Zugabe von 240 µl 0,5 M SDS lysiert. Nach 30 min Extraktion bei 56°C wurde die DNA durch mehrere Ultraschallstöße fragmentiert, anschließend Membranreste durch 15 min Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge pelletiert. Vom Überstand wurden nach einer Proteinbestimmung (Amidoschwarzbestimmung, s. III.4.1) 120 bis 150 µg auf analytische SDS-Polyacrylamidgradientengele, und bis zu 20 mg auf präparative Plattengele aufgetragen.

2.4.2 Westernblot

Westernblotanalysen von induzierten Kolonien zeigten bei allen 5 Clonen ein zusätzlich exprimiertes Protein (Fig. 17; Größen s. Tabelle), das z.T. auch in Comassie-gefärbten Gelen sehr gut sichtbar war. Die halobakteriell codierten Proteine erwiesen sich mit einer Ausnahme als sehr instabil: die Banden waren nur in frischen, mit PMSF stabilisierten Präparationen erkennbar.



- A : RR1 - pcl 857 ts + pJS 7/31
 B₁ : RR1 - pcl 857 ts + pJS 7/18 Δ 2/20
 B : RR1 - pcl 857 ts + pJS 7/18
 C : RR1 - pcl 857 ts + pJS 7/13
 D₂ : RR1 - pcl 857 ts + pJS 6/5 Δ 6/25
 D₁ : RR1 - pcl 857 ts + pJS 6/5 Δ 5/28
 D : RR1 - pcl 857 ts + pJS 6/5
 E : RR1 - pcl 857 ts + pJS 5/8
 F : RR1 - pcl 857 ts

Fig. 17: Westernblot von Lysaten der 5 fluoreszierenden Clone. Als Kontrollen sind der Rezipientenstamm und halobakterielle Membranfraktion aufgetragen. Alle mit bezeichneten Lysate stammen von Deletionsclonen, auf die z.T. weiter unten eingegangen werden wird.

Eine Übersicht über die Eigenschaften der JS-Clone gibt die folgende Tabelle:

Tabelle 2

Clon	Größe des Insertes	Größe des expr. Proteins	Größe der mRNA (s.u.)	Stabilität d. Proteins
pJS5-8	770 bp	27 kD	n.d.	-
pJS6-5	590 bp	19,6 kD	1100 bp	-
pJS7-13	2100 bp	31 kD	n.d.	-
pJS7-18	940 bp	15,5 kD	480, 520 bp	+
pJS7-31	1100 bp	38 kD	n.d.	-

Westernblotanalysen von induzierten Zellen mit Antiseren gegen Flagellin und das halobakterielle 190 kD Zellwandglycoprotein waren dagegen negativ. Diese beiden Antiseren waren von F. Wieland zur Verfügung gestellt worden.

2.4.3 Northernblotanalyse

Um zu klären, ob zu den insertcodierten Sequenzen Transkripte gebildet werden, und um gegebenenfalls deren Größe zu bestimmen, wurde eine Northernblotanalyse durchgeführt. Dafür wurden pro Spur 0,3 µg angereicherter mRNA aus der mittleren logarithmischen Phase, die von R. Schöningh zur Verfügung gestellt wurden, auf ein Agarose-Formamidgel aufgetragen und nach Vorschrift auf Nitrocellulose transferiert. Die fixierte RNA wurde mit den 5 durch Nicktranslation radioaktiv markierten Plasmiden hybridisiert, zur Kontrolle zusätzlich mit dem Vektor und pcI857. Die Autoradiographie des Northernblots zeigte für pJS6-5 und pJS7-18 gut erkennbare Hybridisierung: pJS7-18 hybridisierte mit 2 RNA's von ca. 480 und 520 Nucleotiden, pJS6-5 mit einer RNA von ca. 1100 Basen Länge. Alle übrigen Plasmide hybridisierten nicht oder nur sehr schwach mit der verwendeten RNA-Präparation.

2.4.4 Kreuzhybridisierung der Plasmide untereinander

In Dot-Blot Experimenten wurde Plasmid-DNA aus jedem der 5 JS-Clone nach Markierung durch Nicktranslation mit [³²P]dNTP gegen sich selbst, die 4 anderen und die Kontrollen (pPLc24 und pcI857) hybridisiert. Dabei zeigte sich, daß die Clone untereinander nicht homolog sind, sondern offenbar alle verschiedene Inserts enthalten.

2.4.5 Hybridisierung mit dem Chromosom

Die Plasmide aller durch den Immunotest isolierten Clone wurden nach Markierung durch Nicktranslation mit [^{32}P]dNTP gegen das halobakterielle Chromosom hybridisiert. Für den Southernblot wurden Spaltungen mit den Restriktionsenzymen *Bam* H I, *Eco* R I und *Pst* I durchgeführt. Die Autoradiographien der Southernblots wiesen für jeden der Clone ein anderes Muster auf (s. Tabelle): ein weiterer Beweis dafür, daß die Clone untereinander nicht homolog sind.

Clon	Restrictionsendonuclease		
	<i>Bam</i> H I	<i>Eco</i> R I	<i>Pst</i> I
pJS5-8	13,3	17,3	6,4
pJS6-5	13,8	8,7	15,7
pJS7-13	13,9	18,9	7,9
pJS7-18	4,35	23	1,55
pJS7-31	11,2	19,7	5,45

2.4.6 Restriktionskarten und Sequenzierung

Die Sequenzen der Inserts von vieren der 5 Plasmide wurden ganz oder teilweise unter Anwendung sowohl der Didesoxysequenzierung als auch der Methode nach Maxam und Gilbert bestimmt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der bisher aus Peptidsequenzen des Halorhodopsins ermittelten möglichen DNA-Sequenz verglichen.

(1) pJS 5-8

pJS5-8 wurde überwiegend mit der Methode von Sanger et al. sequenziert. Dafür wurde eine Restriktionskarte für die Enzyme *Taq* I und *Sal* I erstellt.

pJS 5-8

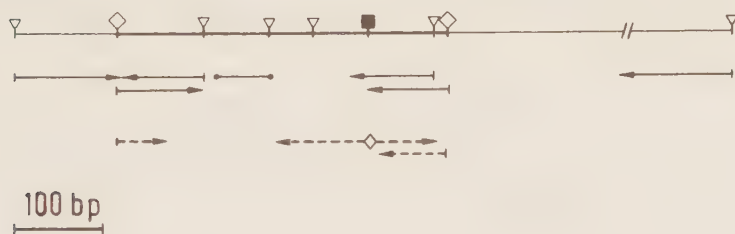


Fig. 18: Restriktionskarte mit den bei der Sequenzierung verwendeten Restriktionsstellen im Insert von pJS5-8. Schwache Linien: Vektorbereiche; starke Linie: Insert pJS5-8. Durchgezogene Pfeile: Sequenzierung nach Sanger; gestrichelte Pfeile: Sequenzierung nach Maxam und Gilbert; für sequenzierte Bereiche mit durch Punkte markierten Enden kann die Orientierung nicht angegeben werden. Erklärung der Symbole für Restriktionsenzyme: s. S. 139 (ausklappbar).

Für die Sequenzierung wurden definierte Fragmente in M13mp8 oder mp9 cloniert und sequenziert. Da auf überlappende Sequenzen kein Wert gelegt wurde, sind nur die Sequenzen der einzelnen Fragmente bestimmt worden. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der bisher aus Peptidsequenzen ermittelten möglichen DNA-Sequenz des Haloopsin-Genes verglichen. Es wurde keinerlei Übereinstimmung gefunden.

(2) pJS6-5

Die Sequenzen von pJS6-5 wurden überwiegend mit der chemischen Sequenzierungsmethode bestimmt. Das Sequenzierungsschema ist unten angegeben:

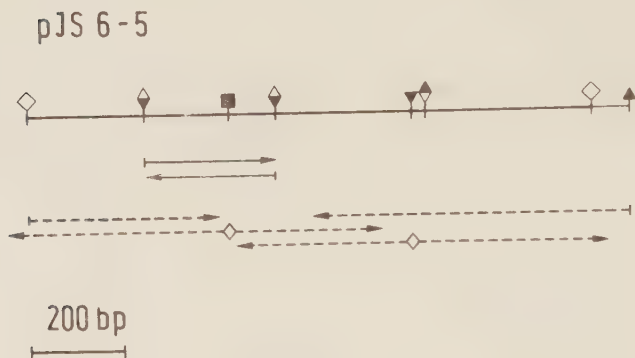


Fig. 19: Restrictionskarte und Sequenzierungsschema für das Insert von pJS6-5. Erklärung der Symbole s. oben bzw. S. 139.

pJS6-5 ist der einzige Clon, dessen Insert vollständig und zusammenhängend sequenziert ist. Die vollständige Sequenz lautet wie folgt:

	10	20	30	40	50
1	GGATCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCTC	CGCGTCACCG	GTCAGGAGAA
51	ATACCCACG	CGGCCGCCGT	AGATGCCCGG	CGGTGTGGCT	TCGATGGCGT
101	CGATGTGCTC	CATGGCGCGA	ACCTTCGGCG	CGCCGAGAG	GGTGCCGCCG
151	GGAACGCCGC	GCGGGTCGCG	TCGAAGGCGT	CGGCGTCGGC	GGCCAGCGTC
201	CCGGTGACCG	TGGATTGCAT	GTGCTGGACG	TGGCTGTA CT	TCAGCACGCG
251	CATGAACTCG	GGCACC GAAG	CGGGTGCGCG	CGCTCACGCG	CGCACGTCGT
301	TGCGCGCGAG	ATCACGAGCG	TCGTGTGTTC	GGCGCGTTCC	TTCTCGTCGG
351	CGAGCATCTC	CCCGGCGTAG	GCGGCGGTCC	GCCACCRTTG	GCGCCGCGCT

```

401 GGCAGGTGCC CGATCGGGTT CGTGACGACG GTGTCGTCGT GGACCGCGAC
451 CAGCGTCTCC GGGCTGGCAC CCACGACCGT GTGGTCCCCG TGCGCGAGCA
501 GGAACATGTA CGGCGAGGGT TGACCGCGCA GCGCGTCGTA GAGCGCCCGC
551 GGGTCGATGT CNCCGTCAAG GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GGATCC*

```

Der Clon erschien besonders vielversprechend, weil er sehr viel Protein exprimierte, dessen mRNA mit 1100 bp ungefähr dem für das Haloopsin-Transcript erwarteten Wert entsprach. Das exprimierte Protein muß auf Grund der Nucleinsäuresequenz folgende Primärstruktur haben:

```

P P P P P P P P R H R S G E I P H A A A V D A P R C G F D
G V D V L H G A N L R R A R E G A A G N A A R V A S K A S A
S A A S V P V T V D S M C W T W L Y F S T R M N S G T E A G
A R A H A R T S L R A R S R A S C V R R V P S R R R A S P R
R R R R S A T X G A A L A G A R S G S

```

Das Raster für die Übersetzung in die Proteinsequenz ergibt sich zu einem aus der Fusion mit den MS2-Replicase-Sequenzen, zum anderen aus Überlegungen zur Größe des zu erwartenden Proteins und der Forderung, daß der durch die Bal31-Resektion (s. IV.2.4.8) herbeigeführte Verlust der antigenen Determinante Teile des exprimierten Proteins betreffen sollte. Eines der beiden anderen möglichen Leseraster ergab einen für das beobachtete Fusionsprotein zu kurzen halobakteriell codierten Anteil (Translationsstop bei Position 70-72). Das dritte mögliche Raster führte zwar zu einem Protein vertretbarer Größe (halobakterieller Anteil von 120 Aminosäuren), das gebildete Protein enthielte aber nicht mehr die Aminosäuren, die für die Wechselwirkung mit dem Antiserum entscheidend waren (s. IV.2.4.8). Das Protein mit dem opal-Stopcodon an Position 423-425 entspricht mit 139 Aminosäuren ungefähr dem aus Proteingelen berechneten halobakteriell codierten Anteil des Fusionsproteins. Auch in diesem Fall stimmte weder Nucleinsäuresequenz noch die daraus abgeleitete Proteinsequenz mit den Erwartungen für

Haloopsin Sequenzen überein.

(3) pJS7-13

pJS7-13 hat das größte Insert aller analysierten Clone; andererseits ist das exprimierte Protein nur ca. 31 kD groß, d.h., da 10 kD auf Kosten des MS2 Polymeraseanteiles gehen, können nur noch die ersten ca. 600 bp für die halobakterielle Hälfte des Fusionsproteins codieren. pJS7-13 wurde deshalb nicht vollständig sequenziert, sondern nur die im unten angegebenen Schema gezeigten Anteile. Die Orientierung bzw. Anordnung der kleinen, mit der Didesoxymethode sequenzierten *Bam* H I Fragmente ist nicht gesichert. Insgesamt sind aber im promotorkontrollierten Teil des Insertes rund 1150 bp sequenziert, deren Vergleich mit der Haloopsin-Backtranslation keinerlei Hinweise auf Homologien ergab.

pJS 7-13



Fig. 20: Restrictions- bzw. Sequenzierungsschema für das halobakterielle Insert von pJS7-13.

(4) pJS7-18

pJS7-18 codiert für das kleinste beobachtete Fusionsprotein. Die ursprünglich halobakteriell codierten Anteile beschränken sich auf maximal 110 Aminosäuren. Die Sequenzierung wurde eingestellt, nachdem feststand, daß die ersten 250 bp keinerlei Homologie zu den erwarteten haloopsinstämmigen Sequenzen haben. Darüberhinaus war zu dem Zeitpunkt durch Bestimmung der Messenger-Länge ohnehin offensichtlich, daß das Insert von pJS7-18 nicht für Teile des Haloopsins codieren könne.

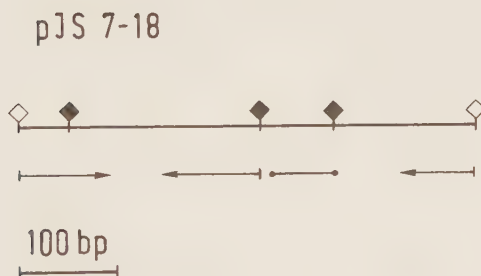


Fig. 21: Restrictions- bzw. Sequenzierungsschema für pJS7-18.

(5) pJS7-31

pJS7-31 wurde nicht sequenziert, da für das exprimierte Protein auf Grund seiner Größe die Identität mit Haloopsin ausgeschlossen werden konnte.

2.4.7 Antikörper gegen 2 der Fusionsproteine

Gegen die Fusionsproteine der beiden am besten exprimierenden Clone, JS6-5 und JS7-18, wurden Kaninchen-Antikörper erzeugt. Dazu wurden mehrfach jeweils ca. 20 mg Lysat induzierter Zellen auf präparative SDS-PAG geladen, die relevante Bande ausgeschnitten und elektroeluiert. Für JS6-5 wurden aus 180 mg Gesamtlisat 950 µg Fusionsprotein gewonnen, für JS7-18 aus 60 mg Gesamtlisat 520 µg Fusionsprotein. Die Kaninchen wurden nach dem Standardprotokoll immunisiert und geboostert, ihr Serum anschließend auf Kreuzreaktion mit Halobakterien-Proteinen getestet. Dabei zeigte sich, daß die Antiseren beider Fusionsproteine mit jeweils mehreren halobakteriellen Proteinen kreuzreagieren, jedoch nicht mit reinem Halorhodopsin. Eine Übersicht gibt die folgende Tabelle:

Tabelle 3: Kreuzreaktionen der Antiseren der Fusionsproteine mit halobakteriellen Proteinen

	Antiserum	
	JS6-5	JS7-18
Membran- proteine	20 kD, 16,5 kD	26 kD
Cytoplasmat. Proteine	17,5 kD	28 kD, 24,5 kD 21,6 kD

2.4.8 Produktion von Deletionsmutanten der pJS-Plasmide

Von einem der pJS-Clone, pJS6-5, wurden Deletionsmutanten hergestellt. Das Plasmid wurde mit *Hin* d III linearisiert, über ein präparatives Agarosegel von nicht linearisierten Anteilen gereinigt und mit der doppelstrangspezifischen Nuclease Bal 31 abgebaut (Gray et al., 1975). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 4 µl Probe entnommen und in 26 µl EGTA-haltigen Puffers (0°C) einpipettiert. EGTA komplexiert das für die Funktion von Bal 31 notwendige Ca^{2+} , ohne die für alle Restriktionsendonucleasen essentiellen Magnesiumionen abzufangen. Die Proben wurden geteilt: 15 µl dienten zur gelelektrophoretischen Bestimmung der verbliebenen DNA-Länge, 15 µl wurden gefällt, in 50 µl T4-Ligase-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 5°C mit 10 U T4-DNA-Ligase ligiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von RR1[pci857] eingesetzt. Alle erzeugten Transformanten wurden auf Expression antigener Determinanten getestet und in die zwei möglichen Gruppen, F⁺ und F⁻ eingeteilt. Von jeder Gruppe wurden ca. 50 Plasmid-Minipräparationen durchgeführt und das kleinste den Phänotyp F⁺ vermittelnde Plasmid (pJS6-5Δ6/25) sowie das größte, F⁻ vermittelnde Plasmid (pJS6-5Δ5/28) ausgewählt. Die Restriktionsanalyse zeigte, daß auch pJS6-5Δ5/28 noch die fast zentral gelegene *Bst* E II Schnittstelle aufweist. Die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert, ausgehend von der [³²p] markierten *Bst* E II Schnittstelle, zeigt Übereinstimmung der Sequenzen von pJS6-5 und der beiden Δ-Plasmide bis zu Aminosäure 100, pJS6-5Δ6/25 hat darüberhinaus noch drei weitere homologe Aminosäuren. Die halobakteriellen Sequenzen sind an den Stellen mit abweichender Aminosäuresequenz fusioniert mit dem pBR-Bestandteil des Vektors, der in den beiden sequenzierten Δ-Plasmiden unterschiedlich weit abgebaut worden war. Im Fall von pJS6-5Δ5/28 beginnen die pBR-Sequenzen mit der Base Nr. 2147; der Translationsstop liegt 70-72 bp weiter, bei Base Nr. 2217-19 (Numerierung der

pBR-Sequenzen nach Sutcliffe, 1973). Das Protein von pJS6-5Δ6/25 wird ab Aminosäure 104 von Base Nr. 2380ff. aus pBR codiert, der Translationsstopp liegt 33 Codons weiter bei den Basen Nr. 2460-62. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4

Aminosäure (s.S. 104)	98	99	100	101	102	103	104	105	106
pJS6-5	<u>Ser</u>	<u>Leu</u>	<u>Arg</u>	<u>Ala</u>	<u>Arg</u>	<u>Ser</u>	<u>Arg</u>	<u>Ala</u>	<u>Ser</u>
pJS6-5Δ5/28	<u>Ser</u>	<u>Leu</u>	<u>Arg</u>	Gly	Gly	Cys	Arg	Glu	Gln
pJS6-5Δ6/25	<u>Ser</u>	<u>Leu</u>	<u>Arg</u>	<u>Ala</u>	<u>Arg</u>	<u>Ser</u>	Leu	Arg	Ser
Base Nr. (s.S. 103)	297	300	303	306	309	312	315	318	321
pJS6-5	<u>TCG</u>	<u>TTG</u>	<u>CGC</u>	<u>GCG</u>	<u>AGA</u>	<u>TCA</u>	<u>CGA</u>	<u>GCG</u>	<u>TCG</u>
pJS6-5Δ5/28	<u>TCG</u>	<u>TTG</u>	<u>CGC</u>	<u>GGC</u>	GGA	TGC	CGG	GAG	CAG
				↑					
Base _{pBR} Nr.					2147	ff.			
pJS6-5Δ6/25	<u>TCG</u>	<u>TTG</u>	<u>CGC</u>	<u>GCG</u>	<u>AGA</u>	<u>TCC</u>	CTG	CGC	TCG
							↑		
Base _{pBR} Nr.							2380	ff.	

Anmerkung: die Numerierung der Aminosäuren beginnt mit dem ersten Prolin.

Die antigene Determinante läßt sich also eingrenzen auf die

Aminosäuren A - R - S bzw. den Bereich um diese Aminosäuren, der durch veränderte Sekundärstrukturen beeinflusst sein konnte.

V. Diskussion

1. Isolierung des Bacterioopsin-Genes

Das Bacterioopsin-Gen aus *Halobacterium halobium* wurde aus einer Genbank halobakterieller DNA durch Hybridisierung mit einem Oligonucleotid isoliert. Von den 12 mit dem Oligonucleotid positiv reagierenden Clonen wurden 2 für die weiteren Arbeiten verwendet, von denen durch Restrictionsanalysen und teilweise Sequenzierung feststand, daß einer das intakte 1,6 kb *Bam* H I-*Bst* E II Fragment mit dem Bacterioopsin-Gen (pHV18-34), der andere (pHV30-63) die vollständige Sequenz des *brp*-Genes enthielt und außerdem mit pHV18-34 überlappte. Das Plasmid pHV18-34, dessen Derivate bei der Konstruktion von Vektoren zur Transformation und Expression im homologen und heterologen System eingesetzt werden sollten, wurde unter zwei Gesichtspunkten verändert:

- (a) der Anteil halobakterieller DNA im Vektor sollte möglichst klein gehalten werden, um die Stabilität der Plasmide in *E. coli* nicht zu gefährden;
- (b) im genabwärts gelegenen Bereich des Bacterioopsin-Genes sollte Restrictionsstellen für *Hin* d III bzw. *Sal* I eingeführt werden.

Anstelle der *Bst* E II-Stelle wurde in pHV18-34ΔE3 ein *Hin* d III-Linker eingesetzt, der die Umclonierung des nunmehr *Bam* H I-*Hin* d III Fragmentes in M13mp9 bzw. fd 109 erleichtern sollte. Diese *Hin* d III-Stelle wurde außerdem bei der Umclonierung in pPLc24 benutzt.

Für die Konstruktion eines Plasmides zur Expression des Bacterioopsins-Genes in *Staphylococcus carnosus*, auf das im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen worden ist, wurde ein Vorläuferplasmid benötigt, das das Bacterioopsin-Gen auf einem Fragment mit einer *Sal* I-Stelle im 3'-Bereich des Genes enthält. Hierfür wurde das genabwärts gelegene 770 bp *Bst* E II Fragment aus pHV18-34 vollkommen deletiert und der linearisierte Vektor durch Nuclease *Bal* 31-Abbau weiter verkürzt. Dabei wurde weder die *Sal* I-Stelle aus pBR322 noch eine 80 bp hinter dem Translationsstop des Bacterioopsin-Genes liegende *Rsa* I-Stelle entfernt. Das resultierende Plasmid pHV18-34ΔB13 enthält somit das Bacterioopsin-Gen auf einem ca. 1,3 kb großen *Bam* H I-*Sal* I Fragment.

2. Isolierung des Genes für das "bacterioopsin-related protein"

Dem "bacterioopsin-related protein" (*brp*) wird ein Einfluß auf die Regulation der Bacterioopsin-Expression zugeschrieben. Pfeifer et al. (1984) und Betlach et al. (1984) fanden bei der Untersuchung von Bacterioopsin-negativen Mutanten Insertionen bis zu 1400 bp genaufwärts und konnten in genau dem Bereich ein auch in vivo transkribiertes Leseraster nachweisen. Das hypothetische Genprodukt ist ein hydrophobes Protein mit 7 potentiellen α -Helices, das auf Grund dieser Eigenschaften ein Membranprotein sein könnte. Betlach und Pfeifer halten allerdings die Regulation über ein Protein für weniger wahrscheinlich als eine Regulation auf Transcriptebene: sie konnten für die 5'-Enden der beiden mRNAs eine Komplementarität für 13 von 14 bp nachweisen. Unter Umständen wird also die Bacterioopsin-translation durch Konkurrenz von Ribosomen und *brp*-mRNA um die *bop*-mRNA reguliert.

Das *brp*-Gen wurde durch Restriktionsanalyse von 10 der 12

mit der Bacterioopsin-spezifischen Probe reagierenden Clone identifiziert. Obwohl das Oligonucleotid komplementär zum dem 5'Ende des Bacterioopsin-Genes ist, enthielt keiner der Clone *bop* und *brp* gemeinsam; das intakte *brp*-Gen konnte nur in pHV30-63 nachgewiesen werden. Durch Kombination der beiden Clone pHV18-34 und pHV30-63 ließ sich der Bereich von *bop*- und *brp*-Gen inclusive der intergenischen Region rekonstituieren (pFE 1).

3. Untersuchung von Mutanten

Die DNA der Halobakterien kann in 2 Teile unterschiedlichen GC-Gehaltes fraktioniert werden. Die GC-reichere Fraktion (68 % GC), die sog. F I DNA (Weidinger et al., 1979), repräsentiert in *Halobacterium halobium* ca. 70 % des Gesamtgenomes. Sie enthält die für Bacterioopsin codierenden Sequenzen (diese Arbeit und Betlach et al. 1983) und alle weiteren bisher bekannten Gene; die zweite Fraktion (F II DNA), mit 58 % GC wesentlich AT - reicher als die F I DNA, besteht zum großen Teil aus verschiedenen circularen extrachromosomalen Elementen (ccc DNA) die in geringer Kopienzahl vorliegen, und einem etwa 6-8fach vorliegenden Hauptplasmid (pHH1) sowie AT - reichen chromosomalen Bereichen, wie sie von Pfeifer & Betlach (1985b) erstmals charakterisiert worden sind.

Während die F I-Anteile des Genomes in Halobakterien der Halobiumgruppe mit Ausnahme der Insertions-"hot spots" relativ stabil zu sein scheinen, unterliegt der F II-Anteil extrem hohen Variationen. Der Vergleich der Gesamt-DNA der Stämme *Halobacterium halobium*, *H. cutirubrum*, und *H. salinarium* zeigt zudem konservierte Restrictionsmuster für den F I-Anteil, so daß Pfeifer (1986) vorschlägt, diese Stämme als eine Species zu betrachten. Im Gegensatz dazu aber sind die Restrictionsmuster der F II DNA dieser Stämme

sehr unterschiedlich, bedingt durch verschiedene stammspezifische Plasmide. Auch Anzahl und Verteilung der bisher bekannten Insertionselemente innerhalb der F II DNA deutet auf größere Variationen hin (Pfeifer et al., 1983). Die AT-reichere F II-DNA scheint ein Reservoir für Insertionselemente darzustellen: ISH 24, 25, 26, 27, 28 und ISH 1.8 kommen im Wildtyp in mehrfacher Kopienzahl nur in der F II-DNA vor; lediglich ISH 1, ISH 2 und ISH 23/50 haben zusätzlich je eine Kopie in der F I-DNA. Diese transponierbaren Elemente erzeugen mit relativ hoher Frequenz Mutationen, denen besondere Bedeutung zukommt, da gezielte in vitro Mutationen auf Grund fehlender Transformations- oder Konjugationssysteme nicht einführbar sind.

Die Analyse mehrerer Mutanten sollte 2 Aufgaben erfüllen:

- (1) Für Transformationsversuche ist ein positives Selektionssystem Voraussetzung. Um Bacteriorhodopsin zur positiven Selektion einsetzen zu können, müssen stabile Bop⁻-Mutanten zur Verfügung stehen. Die Analyse der vorhandenen Mutanten sollte klären, ob bei den erzeugten Mutanten Bacterioopsin-Defizienz auf Grund von Deletionen und Insertionen einerseits, oder Punktmutationen und Veränderungen außerhalb des Strukturgens andererseits vorlag. Mit einer Ausnahme (M24), für die sich keinerlei Bacterioopsin-homologe Sequenz nachweisen ließ, beruhen alle anderen untersuchten Mutationen auf Insertionsereignissen. Bisher gibt es kein Beispiel für Reversion einer Insertionsmutante durch Excision des Insertes; alle Mutanten mit Insertionen im Strukturgen haben sich als stabil erwiesen. Pfeifer et al. (1985a) konnten dagegen für eine Mutante mit Insertion im *brp*-Gen zeigen, daß die beobachtete Reversion zum Phanotyp Bop⁺ auf einer zusätzlichen Insertion im *brp* beruhte.

- (2) Es sollte versucht werden, durch Analyse von

Insertionen in Kombination mit Sequenzdaten Klarheit über eine eventuelle Nachbarschaft der beiden Retinalprotein-Gene zu bekommen. Aus diesem Grund sind mehrere Bacterioopsin- und Haloopsinmutanten vorläufig charakterisiert worden (L 07, L 33, M18, M20, M43RR, M43RW, M114, M187, M188, M191). Die Charakterisierung erfolgte durch Southernblot-Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten 1,6 kb *Bam* H I-*Bst* E II Fragment, auf dem das Bacterioopsin-Gen liegt. Getestet wurde auf Veränderungen dieses Fragmentes im Genom der Mutanten und auf Veränderungen in dem das 1,6 kb-Fragment einschließenden 5,1 kb *Pst* I-Fragment. In der Tabelle IV.2 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Nahezu alle Bacterioopsin-Mutanten haben eine Insertion in das 1,6 kb Fragment erfahren; weitere Experimente müssen klären, ob durch die Insertion das Strukturgen selber oder aber Signalsequenzen betroffen worden sind.

Der Versuch, eine direkte Korrelation zwischen Expression des Haloopsin - Genes und Insertion in das 1,6 kb *Bam* H I-*Bst* E II oder das 5,1 kb *Pst* I-Fragment herzustellen, schlug fehl: Insertionen sowohl im kleineren als auch im größeren der beiden Fragmente führen nicht notwendigerweise zu Haloopsin-Defizienz, aber mit einer Ausnahme zu Bacterioopsin-negativen Mutanten. Inzwischen ist durch die Arbeiten von A. Blanck auch bekannt, daß das Bacterioopsin-Gen nicht auf dem gleichen Cosmid (pABH47) liegt, auf dem das Haloopsin-Gen kürzlich identifiziert werden konnte. Allerdings ist die Position des Haloopsin - Genes auf pABH47 noch nicht untersucht, so daß benachbarte Loci noch nicht völlig ausgeschlossen werden können. Aber auch bei weit voneinander entfernten Loci der Strukturgene kann eine gemeinsame oder ähnliche Regulation beider Gene nicht ausgeschlossen werden, zumal sich beider Expression durch Retinal stimulieren läßt (Schoningh, 1985; Hegemann, 1984).

Die untersuchten Mutanten lassen sich in 3 Gruppen einordnen:

Gruppe	Phanotyp	Insertion in	Beispiele
1	Bop ⁻ , Hop ⁺	beide Fragmente	L 07 L 33 M 20 M 114 (M 188) M43RR
2	Bop ⁻ , Hop ⁻	beide Fragmente	M43RW M 187 M 191
3	Bop ⁺ , Hop ⁻	5,1 kb <i>Pst</i> I	M 18

Für die erste Gruppe läßt sich annehmen, daß durch Insertion in die codierenden Sequenzen des Bacterioopsins kein vollständiges Genprodukt gebildet wird, wie es z.B. für L 33 auch in der Literatur beschrieben worden ist (DasSarma et al., 1983). Die zweite Gruppe ist weniger übersichtlich: Insertionen im 1,6 kb Stück können zwar nachweislich die Expression des Bacterioopsins betreffen, indem sie entweder die codierenden Sequenzen oder die Signalsequenzen des Strukturgenes zerstören, jedoch enthält weder der von Dunn et al. (1981; s. Fig. 3) sequenzierte Bereich noch der in Zusammenarbeit mit Dr. H. Prieß sequenzierte 3' Bereich auf dem 1,6 kb-Fragment (s. Fig. 3) irgendwelche Haloopsin-spezifischen Sequenzen, ebensowenig das angrenzende 770 bp *Bst* E II-*Bst* E II Fragment. Insertionen im 1,6 kb *Bam* H I-*Bst* E II Fragment können also keinesfalls das Haloopsin-Strukturgen betreffen, aber z.B. durch Inaktivierung eines regulativen Elementes die Expression

verhindern. Pfeifer et al. (1984) und Betlach et al. (1984) haben mit dem *brp* ein Gen identifiziert, das diesen Aufgaben unter Umständen gerecht werden konnte, dessen Translationsstart jedoch mehr als 150 bp jenseits der *Bam* H I-Stelle liegt. Die Interpretation ihrer Daten, in der sie die häufig auftretende Kombination von Insertionen in das *brp*-Gen bei gleichzeitiger Bacterioopsindefizienz mit der Notwendigkeit zumindest der Transcription des *brp*-Genes für die Expression des Bacterioopsin-Genes erklären, ist nur für den einzigen Fall aus Gruppe 3) nicht schlussig: die Mutante M18 hat eine ISH2-Insertion im ersten Drittel der codierenden Sequenz des *brp*, exprimiert aber dennoch Bacteriorhodopsin. Allerdings ist nicht beschrieben, ob trotz der Insertion ein Transcript gebildet wird, dessen 5'-Bereich für eine Wechselwirkung mit dem Bacterioopsin-Transcript ausreichend sein könnte.

Zwei Mutanten der obigen Gruppen verdienen darüberhinaus besondere Aufmerksamkeit: M43RW enthält eine Insertion im 1,6 kb Fragment, entspricht also in dieser Hinsicht allen anderen Mitgliedern der Gruppe 2. M43RR aber ist eine Revertante bezüglich der Expression des Haloopsins, die im 1,6 kb Fragment eine weitere Insertion erfahren hat; diese Insertion könnte zur Reversion des Hop⁻-Phänotyps geführt haben. Die Insertionstellen von M43RW und M43RR müssen erst noch genauer charakterisiert werden. Darüberhinaus kann jetzt, da das Haloopsin-Gen zur Verfügung steht, untersucht werden, ob die Mutation und die Reversion durch Veränderungen am Haloopsin-Strukturgen selbst verursacht worden sind oder die Änderung des Phänotyps durch Regulationsphänomene erklärt werden muß.

4. Expression halobakterieller Gene

4.1 Expression des Bacterioopsin-Genes im homologen System

Voraussetzung für die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen an Bacteriorhodopsin-Derivaten ist deren Expression. Prinzipiell wäre es wünschenswert, modifizierte Bacteriorhodopsine in Halobakterien exprimieren zu können. Unter der Voraussetzung eines ungestörten, unveränderten Reifungsprozesses mit Ausbildung der Purpurmembran könnte die Funktion in vivo beobachtet werden.

Zur Zeit gibt es jedoch noch keine Möglichkeit, DNA in irgendeiner Form in Halobakterien einzuführen. Weder sind transduzierende Phagen bekannt, noch ist jemals Konjugation beobachtet worden. Auch ein Transformationssystem steht bisher nicht zur Verfügung. Die Etablierung eines Transformationssystems ist ein zentrales Problem der Halobakterien-Genetik. Obwohl Transformations- und Transfectionsversuche in mehreren Labors durchgeführt worden sind, gibt es abgesehen von Gentransfer zwischen auxotrophen Mutanten bisher keinerlei Hinweise auf Mittel und Wege, eigenes oder gar fremdes Erbgut in Halobakterien einzuschleusen.

Für die Konstruktion eines Transformationsvektors konnte nicht auf konventionelle Ansätze zurückgegriffen werden, da Auxotrophien in Halobakterien ebenso wie viele phänotypische Marker extrem hohe Reversionsraten aufweisen, darüberhinaus auch noch keine Gene des Aminosäuremetabolismus identifiziert oder gar isoliert worden sind. Das einzige bekannte Genprodukt, dessen Gen gut charakterisiert ist und für dessen Regulation Modellvorstellungen existieren, ist das Bacterioopsin, dessen Funktion als positiver Selektionsmarker eingesetzt werden kann. Unter zwar artifiziellen, aber

technisch realisierbaren Bedingungen kann durch Bacteriorhodopsin-abhängiges phototrophes Wachstum Selektionsdruck auf die Zellen des Transformationsgemisches ausgeübt werden kann. Bei einer Generationszeit von ca. 10 h unter anaeroben Bedingungen kann der Erfolg des Transformationsexperimentes nach ca. 1 Woche abgeschätzt werden. Der im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Vektor für die Transformation von stabilen Bacterioopsin-defizienten Mutanten berücksichtigt alle bisher bekannten, die autonome Replikation und die Genexpression betreffenden Erfordernisse: er enthält einen Replikationsorigin aus *Halobacterium* GRB und den Komplex aus *brp*- und *bop*-Gen mit flankierenden Sequenzbereichen aus *Halobacterium halobium*. Bevor er jedoch Anwendung finden kann, muß erstens eine stabile Bacterioopsin-negative Mutante des Stammes isoliert werden, aus dem der halobakterielle Replikationsorigin stammt (*Halobacterium* GRB), da durch Sequenzierung mehrerer ansonsten fast identischer Miniplasmide aus verschiedenen Halobakterienstämmen bekannt ist, daß die potentiellen Originsequenzen starke Unterschiede aufweisen; zweitens müssen von dieser Mutante wiederum stabile restrictionsnegative Stämme isoliert werden. Beide Aufgaben sind bereits in Angriff genommen worden (J. Soppa, persönliche Mitteilung).

4.2 Expression des Bacterioopsin-Genes in *E. coli*

Bei der Auswahl des heterologen Expressionssystemes mußte die Hydrophobizität des gewünschten Genproduktes Bacterioopsin berücksichtigt werden. Die Expression des wahrscheinlich toxischen Proteins mußte induzierbar, gleichzeitig aber effizient sein. Beide Forderungen werden durch Vektoren wie pPlc24 mit dem λ_L -Promotor in Verbindung mit dem in trans zur Verfügung gestellten temperatursensitiven *ci*-Repressor erfüllt. Zusätzlich muß im Fall der heterologen Expression von Bacterioopsin zum Zweck der Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen in

rekonstituierten Systemen berücksichtigt werden, daß der Fremdanteil eines Fusionsproteins sowohl die Struktur als auch die Funktion unerwünscht beeinflussen kann. In diesem Fall mußte also der Expressionsvektor dahingehend manipuliert werden, daß zwar die codierenden Sequenzen des MS2-Replikasegens entfernt wurden, gleichzeitig aber der Abstand von Promotor und Shine-Dalgarno-Sequenzen zum ATG des Bacterioopsins den Bedingungen entspricht, unter denen in anderen Beispielen effiziente Expression beobachtet worden ist. Das reife Protein, das von dem in dieser Arbeit konstruierten Vektor hatte abgelesen werden sollen, enthielte neben dem als Translationsstart notwendigen Methionin der MS2-Polymerase ein Serin, dessen Codon sich aus Bestandteilen beider Gene zusammensetzt und das im Bacterioopsin insofern nicht stören dürfte, als ein Serin auch die letzte Aminosäure der nicht immer vollständig abgespaltenen Präsequenz ist. Bei dem nach diesen Anforderungen konstruierten Plasmid pExEco konnte in *E. coli* keine Bacterioopsin-Expression im erwarteten Maßstab nachgewiesen werden, obwohl der Teil des Transcriptes, dessen korrespondierende Ribonucleotide eine stabile Sekundärstruktur ausbilden können, nämlich die ersten Codons der Präsequenz, ausgelassen worden ist. Bis jetzt ist noch nicht geklärt, ob die Expression auf Transcriptions- oder Translationsebene inhibiert ist. Der negativen Beeinflussung der RNA-Polymerase durch stabile Sekundärstrukturen des Bacterioopsin-Genes könnte durch Substitution des natürlichen Genes mit einem synthetischen, AT-reicheren Gen begegnet werden; sollte sich zeigen, daß auch in diesem System wie bei den pIN-Vektoren Sequenzen aus dem 5'-Bereich der codierenden Sequenz des zur Ribosomenbindungsstelle homologen Proteins einen expressionsfördernden Einfluß haben, muß in Zukunft an Konstruktionen von Fusionsproteinen mit integrierten Proteasespaltstellen gedacht werden.

5. Isolierung des Haloopsin-Genes aus einer Expressionsbibliothek

Nachdem durch Sequenzierungsdaten (unveröffentlichte Ergebnisse) sicher war, daß das Haloopsin nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zum Bacterioopsin-Gen liegt, wurde die Isolierung auf Grund der Expression antigener Haloopsin-Determinanten in *E. coli* angestrebt. Auch in diesem Fall mußte ein Expressionssystem gewählt werden, das die induzierbare Expression eines stark hydrophoben Proteins, in diesem Falle Haloopsin, gestattet. Zudem sollte der benutzte Vektor bereits erfolgreich zur Expression anderer Proteine eingesetzt worden sein. Die Wahl fiel wieder auf den Expressionsvektor pPLc24, mit dem bereits u. a. virale Proteine (Klump et al., 1984) und Interferon (Derynck et al., 1980) als Fusionsproteine exprimiert worden waren. Leider gab es zu dem Zeitpunkt der Konstruktion der Expressionsbibliothek den Vektor nur mit Clonierungsstellen in einem Raster, so daß die erforderliche Rasterverschiebung durch Anfügen von Homopolymeren realisiert werden mußte. Der einzige Nachteil der Insertion mittels homopolymerer G- bzw. C-Enden liegt in der Häufung von Prolinen in der Sequenz des Fusionsproteins, die zwangsläufig zu einem "Knick" jeder Sekundärstruktur führt und damit die Proteasesensitivität des Proteins u. U. erhöhen könnte. Aus 80000 pPLc-Derivaten wurden durch sukzessive Inkubation mit 2 anti-Haloopsin-Antikörpern 5 Clone isoliert, die mit beiden Antikörpern positiv reagierten. Die Analyse dieser Clone ergab jedoch keine Homologien mit den korrespondierenden DNA-Sequenzen der bekannten Haloopsin-Peptide (Hegemann, 1984).

Für die Immunisierung von Kaninchen wurde zum Teil denaturiert angereichertes, zum Teil nativ isoliertes und elektrophoretisch nachgereinigtes Haloopsin verwendet. Dennoch reagierten in *E. coli* exprimierte halobakterielle Proteine, die sich nicht als Haloopsin identifizieren ließen, mit dem polyclonalen Antikörper. Hierfür gibt es

mehrere Erklärungen. Zum einen könnte eine antigene Determinante des Haloopsins in anderen Proteinen ebenfalls vorkommen. Tatsächlich ließ sich eine Kreuzreaktion des anti-Haloopsin-Antikorpers mit mehreren cytoplasmatischen Proteinen nachweisen, obwohl eine Verunreinigung des Antigens mit cytoplasmatischen Komponenten auf Grund des Anreicherungsverfahrens für Haloopsin ausgeschlossen werden kann. Zum anderen konnten hydrophobe Verunreinigungen gleichen Molekulargewichtes mit sehr viel höherer Antigenizität während der Haloopsin-Reinigung mit angereichert worden sein. Im Molekulargewichtsbereich zwischen 23 und 26 kD ist inzwischen noch ein weiteres Protein isoliert und charakterisiert worden: das halobakterielle Flagellenprotein (Flagellin; Alam & Oesterhelt, 1984; Wieland, persönl. Mitteilung, 1985). Eine Verunreinigung mit Flagellin konnte jedoch durch Kreuzversuche mit einem Anti-Flagellin-Antikörper von F. Wieland ausgeschlossen werden. Durch Kreuzhybridisierung mit dem in einer parallelen Arbeit von A. Blanck mittels Koloniehybridisierung isolierten Haloopsin-Gen konnte auch die Identität des Insertes aller JS-Clone mit Haloopsin endgültig ausgeschlossen werden. Der Isolierung des Haloopsin-Genes lagen Peptidsequenzen zugrunde (Hegemann 1984), zu denen die korrespondierenden, der Degeneration des genetischen Codes Rechnung tragenden Oligonucleotidmischungen synthetisiert worden waren. Wie sich jetzt gezeigt hat, sind mehrere der nach Bromcyanspaltung ansequenzierten Peptide im Strukturgen nicht nachweisbar. Das läßt die Vermutung zu, daß das als "Haloopsin" isolierte Protein ein Gemisch von 2 oder auch mehr einander sehr ähnlichen Proteinen darstellt, die durch herkömmliche Anreicherungsverfahren nicht zu trennen sind. Zur Diskussion steht in diesem Zusammenhang vor allem das dritte, bisher nur funktionell charakterisierte Retinalprotein, das Sensorrhodopsin (Bogomolni & Spudich, 1982). An der Isolierung und photochemischen Charakterisierung dieses Proteins, dessen Funktion offenbar in der Perzeption von

Lichtreizen photosensorisch aktiver Zellen besteht, wird zur Zeit gearbeitet (S. Schegk, personl. Mitteilung). Es bleibt abzuwarten, ob sich nach der Identifizierung von Sensoropsin-Peptiden Homologien zu den DNA-Sequenzen eines der JS-Clone nachweisen lassen.

VI. LITERATUR

Alam, M. & Oesterhelt, D. (1984) Morphology, function and isolation of halobacterial flagella; J. Mol. Biol. 176, 459-475

Amersham-Protokoll: M13 cloning and sequencing handbook; Amersham International plc, UK

Bamberg, E., Hegemann, P., Oesterhelt, D.: Reconstitution of the light-driven electrogenic ion pump halorhodopsin in black lipid membranes; Biochim. et Biophys. Acta, 773, 53-60 (1984)

Betlach, M., Pfeifer, F., Friedman, J. & Boyer, H.W. (1983) Bacterioopsin mutants of *Halobacterium halobium*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1416-1420

Betlach, M., Friedman, J., Boyer, H.W. & Pfeifer, F. (1984) Characterization of a halobacterial gene affecting bacterio-opsin gene expression; Nucleic Acid Research 12, 7949-7959.

Biggins, M.D., Gibson, T.J. & Hong, G.F. (1983) Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3963-3965

Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; Nucl. Acid Res. 7, 1513-1523.

Bogomolni, R.A. & Spudich, J.L. (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6250-6254

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., (1977) Gene construction and characterization of new cloning vehicles, II. multiple cloning system; *Gene* 2, 95-113.

Boyer, H.W. & Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E.coli*; *J.Mol.Biol.* 41, 459-472.

Calos, M.P. & Miller, J.H. (1980) Transposable elements; *Cell* 20, 579-595

Chang, S.H., Majumdar, A., Dunn, R., Makabe, O., RajBhandary, U.L., Khorana, H.G., Ohtsuka, E., Tanaka, T., Taniyama, Y.O. & Ikehara, M. (1981) Bacteriorhodopsin: partial sequence of mRNA provides aminoacid sequence in the precursor region; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3398-3402

Clewell, D.B. (1972) Nature of Col E 1 plasmid replication in the presence of chloramphenicol; *J.Bacteriol.* 110, 667-676.

Daniels, Ch.J , Hofman, J.D., Mac Williams, J.G., Doolittle, W.F., Woese, C.R., Luehrsen, U.R. & Fox, G.E. (1985) Sequence of 5S ribosomal RNA gene regions and their products in the archaebacterium *Halobacterium volcanii*; *Mol. Gen. Genet.* 198, 270-274

Danon, A. & Stoeckenius, W. (1974) Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1234-1238

DasSarma, S., RajBhandary, U.L. & Khorana, H.G. (1983) High frequency spontaneous mutation in the bacterio-opsin gene in *Halobacterium halobium* is mediated by transposable elements; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2201-2205.

Davis, R.W., Botstein, B. & Roth, J.R. (eds; 1980) "Advances in Bacterial Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Dennis, P.P. (1985) Multiple promoters for the transcription of the ribosomal RNA gene cluster in *Halobacterium halobium*; J. Mol. Biol., in press

Derynck, R., Remaut, E., Saman, E., Stanssens, P., De Clercq, E., Content, J. & Fiers, W. (1980) Expression of human fibroblast interferon gene in *Escherichia coli*; Nature 287, 193-197

De Wachter, R., Chen, M.-W. & Vandenberghe, A. (1984) Equilibria in 5S rRNA structure; Biochem. 143, 175-182

Dunn, R., McCoy, J., Simsek, M., Majumdar, A., Chang, S.H., RajBhandary, U.L. & Khorana, H.G. (1981) The bacteriorhodopsin gene; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6744-6748.

Ebert, K., Goebel, W. & Pfeifer, F. (1984) Homologies between heterogeneous extrachromosomal DNA populations of *Halobacterium halobium* and four new halobacterial isolates; Mol.Gen.Genet. 194, 91-97.

Efstradiatis, A. & Villa-Komaroff, L. (1979) Cloning of double-stranded DNA; in: Genetic engineering (ed. J.K.Setlow and A. Hollaender), Vol. 1, 15-36; Plenum Press, New York.

Ey, P.L., Prowse, S.J. & Jenkin, C.R. (1978) Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A sepharose; Immunochemistry 15, 429-436.

Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserenterant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F., Raeymakers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G. & Ysebaert, M. (1976) Complete nucleotide sequence of

bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene; *Nature* 260, 500-507

Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsén, K.R., Chen, K.N. & Woese, C.R. (1980) The phylogeny of prokaryotes; *Science* 209, 457-463

Fritz, H.-J., Eick, D. & Werr, W. (1982) Analysis of synthetic oligodeoxyribonucleotides; in: Chemical and enzymatic synthesis of gene fragments (eds. H.G.Gassen & A.Lang), p. 199-223, Verlag Chemie, Weinheim.

Garett, R., Leffers, H., Kjems, J., Larsen, N. & Ostergaard, L. (1985) Organization of the ribosomal operons of *Halococcus morrhuae* and *Desulforococcus mobilis*; EMBO Workshop on the Molecular Genetics of Archaeobacteria, Martinsried

Goding, J. (1976), Conjugation of antibodies with fluorochromes: modifications to the standard methods; *J. Immunol. Meth.* 13, 215-226.

Gray jr., H.B., Ostrander, D.A., Hodnett, J.L., Legerski, R.J. & Robberson, D.L. (1975) Extracellular nucleases of *Pseudomonas* Bal 31, I. Characterization of single-strand-specific deoxyriboendonuclease and double-strand deoxyribo-exonuclease activities; *Nucl. Acid Res.* 2, 1459-1492

Hartmann, R. & Oesterhelt, D. (1977) Bacteriorhodopsin-mediated photophosphorylation in *Halobacterium halobium*; *Eur. J. Biochem.* 77, 325-335

Hegemann, P. (1984) Halorhodopsin, die lichtgetriebene Protonenpumpe in *Halobacterium halobium*; Dissertation an der

Universität München

Heil, A. & Zillig, W. (1970) Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-Polymerases from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription; FEBS 11, 165-168.

Hubacek, I. und Glover, S.W. (1970) Complementation Analysis of temperature-sensitive host specificity mutations in *E.coli*; J.Mol.Biol.50, 111-127

Huet, J. Schnabel, R., Sentenac, A. & Zillig, W. (1983) Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type; EMBO J. 2, 1291-1294

Johnston, A. & Thorpe, R. (eds.; 1982) "Immunochemistry in Practice", p. 258-259, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Kagramanova, V.K., Mankin, A.S., Baratova, L.A. & Bogdanov, A.A. (1982) The 3'terminal nucleotide sequence of *Halobacterium halobium* 16 S rRNA; FEBS Letters 144, 177-180.

Kaine, B.P., Gupta, R. & Woese, C.R. (1983) Putative introns in tRNA genes of prokaryotes; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3309-3312

Katz, L. Kingsbury, D.T. & Helinski, D.R. (1973) Stimulation by cyclic adenosine monophosphate of plasmid deoxyribonucleic acid replication and catabolic repression of the plasmid deoxyribonucleic acid-protein relaxation complex; J. Bacteriol. 114, 577-591.

Kessel, A. & Klink, F. (1980) Archaeobacterial elongation factor is ADP ribosylated by diphtheria toxin; Nature287, 250-251

Khorana, H.G., Gerber, G.E., Herlihy, W.C., Gray, C.P., Anderegg, R.J., Nihei, K & Biemann, K. (1979) Amino acid sequence of bacteriorhodopsin; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5046-5050

Klump, W., Marquardt, O. & Hofschneider, P.H. (1984) Biologically active protease of foot and mouth disease virus is expressed from cloned viral cDNA in *Escherichia coli*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3351-3355

König, H. & Kandler, O. (1979) The amino acid sequence of the peptide moiety of the pseudomurein from *Methanobacterium thermoautotrophicum*; Arch. Microbiol. 121, 271-275

Konigsberg, W.H. & Henderson, L. (1983) Removal of sodium dodecyl sulfate from proteins by ion-pair extraction; Methods in Enzym. 91, 254-259.

Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.-W., Kramer, B., Pflugfelder, M. & Fritz, H.-W. (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutagenesis; Nucl. Acid Res. 12, 9441-9456

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4; Nature 227, 680-685.

Lake, J.A., Henderson, E., Clark, M.W. & Matheson, A.T. (1982) Mapping evolution with ribosome structure: Intralinear constancy and interlineage variation; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5948-5952

Langworthy, T.A., Tornabene, T.G. & Holzer, G. (1982) Lipids of archaebacteria; Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 3, 228-244

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. & Boedtker, H. (1977)

RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination; *Biochemistry* 16, 4743-4750

Loening, U.E. (1969) The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamid-gel electrophoresis; *Biochem. J.* 113, 131-138.

Mandel, M. & Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage-DNA infection; *J. Mol. Biol.* 53, 159-162.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982) "Molecular Cloning"; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C. & Quon, D. (1978) The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA; *Cell* 15, 687-701.

Mankin, A.S., Kagramanova, V.K., Teterina, N.L., Rubtsov, P.M., Belova, E.N., Kopylov, A.M., Baratova, L.A. & Bogdanov, A.A. (1985) The nucleotide sequence of the gene coding for the 16S rRNA from the archaeobacterium *Halobacterium halobium*; *Gene* 37, 181-189

Matheson, A.T. & Yaguchi, M. (1982) The evolution of the archaeobacterial ribosome; *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C* 3, 192-199

Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 560-564

Messing, J. & Vieira, J. (1982) A new pair of M13 vectors for selecting either strand of double-digest restriction fragments; *Gene* 19, 269-276.

Mevarech, M. & Werczberger, R. (1985) Genetic transfer in

Halobacterium volcanii; J. Bacteriol. 162, 461-462

Milanytch, M. (1973); Isolierung der Lipide der Purpurmembran aus *Halobacterium halobium* R1; Diplomarbeit Universität München

Moore R.L. & McCarthy, B.J. (1969) Characterization of the deoxyribonucleic acid of various strains of halophilic bacteria; J. Bacteriol. 99, 248-254

Nicholson, D.E.jr., Michalik, J. & Fox, G.E. (1985) Studies on extreme halophile 5S rRNAs; EMBO Workshop on the molecular genetics of archaebacteria, Martinsried

Oertel, W., Kollek, R., Beck, E. & Goebel, W. (1979) The nucleotide sequence of a DNA fragment from the replication origin of the antibiotic resistance factor R1drrd19; Molec. Gen. Genet. 171, 277-285

Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*; Nature New Biol. 233, 149-152

Oesterhelt, D. (1974) Bacteriorhodopsin as a light-driven proton pump; in: Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation (eds. Azzone, G.F., Klingenberg, M.E., Quagliariello, e. & Siliprandi, N.), 79-84

Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. (1974) Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane; Methods in Enzym. 31, 667-678

Oesterhelt, D. & Krippahl, G. (1983) Phototrophic growth of Halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants; Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 134 B, 137-150

Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Feigina, M.Y., Kiselev, A.B. & Lobanov, N.A. (1979) The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview; FEBS Lett. 100, 219-224

Ovchinnikov, Y.A., Zozulya, S.A., Zaitseva, E.M., Guriev, S.O., Sverdlov, E.D., Krupenko, M.A., Aleksandrov, A.A. (1984) A new insertion element of *Halobacterium halobium* is localized in the bacterioopsin gene; Bioorgan. Chem. 10, 560-563

Peacock, S.L., McIver, C.M. & Monahan, J.J. (1981) Transformation of *E.coli* using homopolymer-linked plasmid chimeras; Biochim.Biophys.Acta 655, 243-250.

Pfeifer, F., Weidinger, G. & Goebel, W. (1981a) Characterization of plasmids in *Halobacteria*; Journal of Bacteriology 145, 369-374.

Pfeifer, F., Weidinger, G. & Goebel, W. (1981b) Genetic variability in *Halobacterium halobium*; J. Bacteriol. 145, 375-381

Pfeifer, F., Betlach, M., Martienssen, R., Friedman, J. & Boyer, H.W. (1983) Transposable elements of *Halobacterium halobium*; Mol. Gen. Genet. 191, 182-188

Pfeifer, F., Friedman, J., Boyer, H.W. & Betlach, M. (1984) Characterization of insertions affecting the expression of the bacterioopsin gene in *Halobacterium halobium*; Nucleic Acid Res. 12, 2489-2497

Pfeifer, F., Boyer, H.W. & Betlach, M. (1985a) Restoration of bacterioopsin gene expression in a revertant of *Halobacterium halobium*; J. Bacteriol. 164, 414-420

Pfeifer, F. & Betlach, M. (1985) Genome organization in

Halobacterium halobium; a 70 kb island of more (AT) rich DNA in the chromosome; Mol. Gen. Genet. 198, 449-455

Pfeifer, F. (1986) Genetics of Halobacteria in : CRC Uniscience, Boca Raton, USA: Halophilic Bacteria (ed. F. R. Valera), in press

Remaut, E., Stanssens, P. & Fiers, W. (1981) Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the P_L promoter of coliphage lambda; Gene 15, 81-93

Remaut, E., Tsao, H. & Fiers, W. (1983) Improved plasmid vectors with a thermoinducible expression and a temperature-regulated runaway replication; Gene 22, 103-113.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA Polymerase I; J.Mol.Biol. 113, 237-251.

Rouchoudhury, R., Jay, E. & Wu, R. (1976) Terminal labelling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase; Nucleic Acid Res. 3, 101-116

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467

Schnabel, H., Schramm, E., Schnabel, R. & Zillig, W. (1982) Structural variability in the genome of phage ϕH of *Halobacterium halobium*; Mol. Gen. Genet. 188, 370-377

Schnabel, H. & Zillig, W. (1983) Circular structure of the genome of ϕH in a lysogenic *Halobacterium halobium*; Mol. Gen. Genet. 193, 422-426

Schnabel, R. Thomm, M., Gerardy-Schahn, R., Zillig, W. Stetter, K.O. & Huet, J. (1983) Structural homology between different archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerases analyzed by immunological comparison of their components; EMBO J. 2, 751-755

Schobert, B. & Lanyi, J.K. (1982) HR is a light-driven chloride pump; J. Biol. Chemistry 257, 10308-10313

Schoningh, Roswitha (1985) Zur Biosynthese des Bakterio-opsins; Dissertation an der Universität München

Simsek, M., DasSarma, S., RajBhandary, U.L. & Khorana, H.G. (1982) A transposable element from *Halobacterium halobium* which inactivates the bacteriorhodopsin gene; Proc. Natl. Acad. Sci USA 79, 7268-7272

Southern, E.M. (1975), Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis; J. Mol. Biol. 98, 503-517

Steiner, M. & Oesterhelt, D. (1983) Isolation and properties of the native chromoprotein halorhodopsin; EMBO-Journal 2, 1379-1385 505, 215-278

Steiner, M. (1984) Isolierung und Charakterisierung des nativen Halorhodopsins aus *Halobacterium halobium*; Dissertation an der Universität München

Stoeckenius, W., Lozier, R.H., Bogomolni, R.A. (1979) Bacteriorhodopsin and the purple membrane of Halobacteria; Biochim. Biophys. Acta 505, 215-278.

Stöffler-Meilicke, M., Schwedler-Breitenreuther, G., Lotti, M., Strobl, O., Böck, A. & Stöffler, G. (1985) Electron microscopy of archaeobacterial ribosomes; EMBO Workshop on the molecular genetics of archaeobacteria, Martinsried

Sutcliffe, J.G. (1979) Complete Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77-90

Thomas, P.S. (1983) Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to Nitrocellulose paper; Methods in Enzym. 100, 255-266.

Towbin, H., Staehlinger, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354

Vieira, J. & Messing, J. (1982) The pUCplasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers; Gene 19, 259-268

Vogelsang, H., Oertel, W., Oesterhelt, D. (1983) The isolation of the bacteriorhodopsin gene; Methods in Enzym. 97, 226-241

Waehnelt, T.V. (1971) Preparative isolation of membrane proteins by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of ionic detergent (SDS): Proteins of rat brain myelin; Anal. Biochem. 43, 306-312

Wagner, G., Oesterhelt, D., Krippahl, G., Lanyi, J.K. (1981) Bioenergetic role of bacteriorhodopsin in *Halobacterium halobium* cells; FEBS Letters 131, 341-345

Weidinger, G., Klotz, G. & Goebel, W. (1979) A large plasmid from *Halobacterium halobium* carrying genetic information for gas vacuole formation; Plasmid 2, 377-386

Woese, C.R. & Fox, G.E. (1977) Phylagenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms; Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 74, 5088-5090

Xu, W.-L. & Doolittle, W.F. (1983) Structure of the archaeobacterial transposable element ISH50; Nucleic Acid Research 11, 4195-4199

Yang, R.C.-A., Lis, J. & Wu, R. (1979) Elution of DNA from agarose gels after electrophoresis; Methods in Enzym. 68, 176-182.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors; Gene 33, 103-119

Zoller, M.J. & Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors; Meth. Enzym. 100, 468-500

VII. Abkürzungen

ap	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	Bakterielle alkalische Phosphatase
bp	Basenpaar
BSA	Albumin aus Rinderserum
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphate
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
FITC	Fluoresceinisithiocyanat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalacto- pyranosid
kb	Kilobasenpaar
kD	kilo Dalton
km	Kanamycin
OD	Optische Dichte
p.f.u.	Plaque forming unit
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
tc	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylen- diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D- galactopyranosid

VIII. ZEICHENERKLÄRUNG

Zeichen

Bedeutung

Schnittstelle für *Aat* II*Ava* I*Asp* 718*Bam* H I*Bgl* I*Bst* E II*Eco* R I*Hin* d III*Pst* I*Pvu* I*Rsa* I*Sal* I*Taq* I*Xho* II

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. D. Oesterhelt am Max-Planck-Institut für Biochemie angefertigt.

Ich danke Prof. Oesterhelt für sein Interesse, die Förderung dieser Arbeit sowie für die Möglichkeit, mein Biologiestudium neben der Doktorarbeit fortzuführen und abzuschließen.

Mein besonderer Dank gilt Jutta Straub für ihre konstruktive Mitarbeit und ihr Engagement.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. W. Oertel für seine Einführung in molekularbiologische Techniken und Denkweisen und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Des weiteren möchte ich Dr. Prieß (†) für die Einführung in die Sequenzierungstechnik nach Maxam und Gilbert danken, Dr. R. Schöningh für halobakterielle RNA, Dr. F. Pfeiffer für Hilfe beim Umgang mit Sequenzanalyseprogrammen und den Mitgliedern der Abteilung, insbesondere des "Oe-Labors" dafür, daß es trotz allem immer etwas zu lachen gab.

Lebenslauf

Geburtsdatum	17.4.1956
Geburtsort	Hannover
Eltern	Dr. Horst Vogelsang und Ursula Vogelsang, geb. Siebert

Schulbildung

1963-1966	Grundschule in Hannover
1966-1968	Gymnasium Elsa-Brandstrom-Schule in Hannover
1968-1974	Gymnasium Melle in Melle
1974	Abitur am Gymnasium Melle

Studium

1974-1980	Studium der Chemie an der Universität Würzburg
1979-1980	Diplomarbeit an der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. D. Oesterheld; Thema: "Anaerobes Wachstum bei <i>Halobacterium halobium</i> "
1976-1984	Studium der Biologie an der Universität Würzburg
1983-1984	Diplomarbeit an der Universität Würzburg, durchgeführt am Max-Planck-Institut für Biochemie unter der Leitung von Prof. D. Oesterheld; Thema: "Halophage ϕ N"
Seit 1980	Doktorarbeit unter der Leitung von Prof. D. Oesterheld am Max-Planck-Institut für Biochemie

